

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Massberg



*Die Rolle des Immunglobulin A - Paraproteins in der Entstehung der
venösen Thrombose im Mausmodell des Multiplen Myeloms*

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Felix Stephan

aus

Pforzheim

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Erster Gutachter: Prof. Dr. Konstantin Stark
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Christoph Reichel
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Helmut P. Arbogast

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PhD. Badr Kilani
Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.01.2024

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	8
II. Literaturübersicht	9
1. Die venöse Thrombose	9
1.1 Definition	9
1.2 Primäre Hämostase	9
1.3 Sekundäre Hämostase	10
1.4 Die Pathogenese der venösen Thrombose	11
1.5 Risikofaktoren	12
2. Beteiligung des Immunsystems an der venösen Thrombose	13
2.1 Das Konzept der Immunothrombose	13
2.1.1 Definition	13
2.1.2 Mechanismus	14
2.1.3 Die prothrombotische Wirkung von Antikörpern und des Komplementsystems	14
2.2 Das angeborene und das adaptive Immunsystem	16
2.3 Das Komplementsystem	17
2.4 Entwicklung und Reifung der B-Zellen.....	18
2.5 Antikörperproduktion.....	19
2.6 Antikörperstruktur und –funktion.....	20
2.7 Das Immunglobulin A	21
2.7.1 IgA und die Beteiligung am mukosalen Immunsystem	21
2.7.2 Struktur	22
2.7.3 Produktion und Sekretion von IgA	23
2.7.4 IgA-Rezeptoren	23
2.7.5 IgA-assoziierte Pathologien	25
2.7.6 IgA und das Komplementsystem	26
2.8 Zukünftige therapeutische Herausforderungen der Thrombosebehandlung	27
3. Multiples Myelom	28
3.1 Definition und Entstehung	28
3.2 Epidemiologie und Risikofaktoren	29
3.3 Diagnostische Kriterien	30
3.4 Monoklonale Gammopathien und Paraprotein.....	31
3.5 Behandlung des Multiplen Myeloms.....	32
3.6 MOPC-Mausmodell	33
3.7 Erhöhte Thrombosegefahr bei Patienten mit Multiplem Myelom	34
3.8 Risikofaktoren für Thrombosen bei Patienten mit Multiplem Myelom.....	35
3.9 Aktuelle Therapie der Thrombose und Problemstellung	36
4. Zielsetzung	37
III. Methoden	40
1. Versuchstiere	40
1.1 Die Maus als Tiermodell	40
1.2 Tierhaltung	41
2. Operative Eingriffe	41
2.1 Intravenöse Injektionen.....	41
2.2 DVT-Operationsverfahren: Mausmodell der venösen Thrombose	43
2.2.1 Grundlegendes	43
2.2.2 Versuchsvorbereitung	44
2.2.3 Pharmakologie	44

2.2.4 Narkoseeinleitung und Narkoseaufrechterhaltung	46
2.2.5 Freilegung und Ligatur der Vena cava inferior	47
2.2.6 Erwachen aus der Narkose und Postanalgesie	48
2.2.7 Beendigung des Versuchs und intrakardiale Blutentnahme	48
2.2.8 Aufbereitung von Vollblut	49
2.2.9 Entnahme der Vena cava inferior	49
2.2.10 Organ- und Knochenentnahme.....	50
3. Mikroskopie	51
3.1 Prinzip der Fluoreszenz	51
3.2 Epifluoreszenzmikroskopie	51
3.3 Konfokalmikroskopie	52
4. Immunhistologie	52
4.1 Kryoschnitte	52
4.2 Paraffinschnitte	53
4.3 Färbung muriner Thromben.....	53
4.4 Färbung muriner Paraffinschnitte	54
5. Zellkultur.....	55
5.1 Auftauen und Ansetzen der Zellkultur	55
5.2 Medienwechsel und Splitting.....	56
5.3 Zellzählung	57
5.4 Einfrieren.....	58
6. In-vitro Experimente.....	58
6.1 ELISA	58
6.1.1 Grundlegendes	58
6.1.2 Versuchsvorbereitung	59
6.1.3 Versuchsdurchführung	60
6.2 NETosis-Assay.....	62
6.2.1 Grundlegendes	62
6.2.2 Versuchsvorbereitung	63
6.2.3 Neutrophilenisolierung.....	63
6.2.4 Versuchsdurchführung	64
6.3 Aggregometrie.....	65
6.3.1 Grundlegendes	65
6.3.2 Versuchsvorbereitung	66
6.3.3 Versuchsdurchführung	66
IV. Ergebnisse.....	68
1. Die IgA-Paraprotein-Konzentration steigt mit der injizierten Zellzahl von MOPC315.BM und der Wartezeit an.....	68
2. Die IgA-Paraprotein-Konzentration als Kennziffer zur Beurteilung der Tumorlast	70
2.1 Anämie und Gewichtsveränderung unter dem Einfluss von IgA-Paraprotein.....	70
2.2 Ansiedlung der Myelomzellen im Knochenmark	76
2.3 Extramedulläre Hämatopoese in der Milz nach Injektion der Myelomzellen	78
3. Ausbildung von NETs nach Inkubation von Neutrophilen mit IgA-Paraprotein	82
4. Erhöhte thrombozytäre ATP-Freisetzung nach Inkubation mit MOPC315-Zellkulturüberständen	85
5. Einfluss von IgA-Paraprotein auf das Thrombosemodell	86
5.1 Reduktion der Monozytenzahl im Thrombus	86
5.2 IgA-Paraprotein übt keinen Einfluss auf Thrombusgewicht und -inzidenz aus	90

V. Diskussion	93
1. Beurteilung des MOPC-Mausmodells zur Abbildung des Multiplen Myeloms	93
2. Aktivierung von neutrophilen Granulozyten durch IgA-Paraprotein	95
3. Keine vermehrte Thrombusbildung unter dem Einfluss von IgA-Paraprotein	97
4. Fazit	100
VI. Zusammenfassung	101
VII. Summary.....	102
VIII. Abbildungsverzeichnis.....	103
IX. Literaturverzeichnis.....	104
X. Danksagung	112
XI. Affidavit.....	113
XII. Lebenslauf.....	114
XIII. Publikationsliste.....	115

I. Einleitung

Als Multiples Myelom wird eine maligne Erkrankung der Plasmazellen im Knochenmark bezeichnet, die durch abnormale Produktion monoklonaler Immunglobuline gekennzeichnet ist [3, 4]. Die Erkrankung tritt typischerweise im höheren Lebensalter auf und zeichnet sich durch Ausbildung zahlreicher lebensbedrohlicher Begleiterscheinungen aus: Neben Knochenfrakturen, Blutarmut, Niereninsuffizienz und Hyperkalzämie ist ein erhöhtes Risiko venöser Thrombosen charakteristisch für das Krankheitsbild [4-7]. Dies ist insofern problematisch, da das erhöhte Thromboserisiko erkrankter Myelom-Patienten ebenfalls mit einer erhöhten Sterblichkeit assoziiert ist [8]. Zur Vorbeugung thrombotischer Ereignisse werden üblicherweise Antikoagulantien verabreicht, die jedoch bei übermäßiger Gerinnungshemmung wiederum zu einer Erhöhung des Blutungsrisikos führen können [9].

Die zugrundeliegenden Mechanismen der erhöhten Thromboseinzidenz bei Myelom-Patienten sind bis heute nicht vollständig geklärt. Unsere Arbeitsgruppe konnte zur Aufdeckung der prothrombotischen Rolle von Antikörpern und des Komplementsystems im Rahmen der venösen Thrombose entscheidend beitragen [10]. Noch bisher unveröffentlichte Daten könnten auch wesentlich zur Aufklärung der pathologischen Mechanismen der Thrombose im Zusammenhang mit der Plasmazellerkrankung dienen. Mithilfe eines IgA-Paraprotein-produzierenden Mausmodells, welches in den Versuchstieren eine Myelom-Erkrankung auslöst, sollen die Ursachen für das erhöhte Aufkommen venöser Thrombosen genauer untersucht werden. Nach aktuellem Stand der Forschung ist bekannt, dass IgA in der Lage ist, den alternativen Weg und den Lektin-Weg des Komplementsystems zu aktivieren [11-15]. Eine Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg spielt nach aktuellem Kenntnisstand nur eine untergeordnete Rolle [11, 14].

Zusammengefasst soll in diesem Projekt untersucht werden, ob das von Myelomzellen produzierte IgA-Paraprotein in der Lage ist, über eine Aktivierung des Komplementsystems die Thrombusbildung zu verstärken. Ziel ist es hierbei, die zugrundeliegenden Mechanismen der Thrombusentstehung beim Multiplen Myelom zu untersuchen. Des Weiteren soll in diesem Zusammenhang der Effekt von IgA-Paraprotein auf verschiedene Zelltypen geprüft werden, um dessen potentiell prothrombotische Rolle zu bestätigen.

II. Literaturübersicht

1. Die venöse Thrombose

1.1 Definition

Als venöse Thrombose bezeichnet man im Allgemeinen die Ausbildung eines Blutgerinnsels in den Venen. Das Gerinnsel -häufig auch als Thrombus bezeichnet- ist meist primär in den tiefen Becken- und Beinvenen lokalisiert. Aus diesem Grund spricht man häufig auch von der sogenannten tiefen Beinvenenthrombose. Von dort kann es zur Ablösung des Thrombus kommen, wodurch sekundär weitere Gefäßverschlüsse möglich sind. Ein lebensbedrohliches Szenario stellt die Ausbildung einer Lungenembolie infolge eines Verschlusses der Pulmonalarterien dar: Nach Herzinfarkt und Schlaganfall zählt dies zu den häufigsten Todesursachen, denen Erkrankungen des Herzkreislaufsystems zugrunde liegen [16, 17].

1.2 Primäre Hämostase

Der Vorgang der primären Hämostase dient der ersten Blutungsstillung nach Verletzung eines Blutgefäßes. Bei diesem Vorgang nehmen insbesondere Thrombozyten eine wichtige Rolle ein. Im ersten Schritt kommt es zur Bindung von Plättchen an das kollagenhaltige Subendothel. Die Anlagerung erfolgt über den Membranproteinkomplex GP Ia/IIa sowie über den von-Willebrand-Faktor (vWF). Auf die Adhäsion der Plättchen folgt die Thrombozytenaggregation. Durch Ausbildung gemeinsamer Fibrinogenverbindungen wird die Anhaftung der Plättchen verstärkt. Insbesondere über das Integrin α IIb β 3 wird eine gegenseitige Verfestigung des Thrombozytenpfropfes ermöglicht. Hierbei wird unter anderem die Vernetzung von Fibrinogen, vWF, Kollagen, Fibronectin und Vitronectin gefördert. Die aktivierten Thrombozyten setzen aus elektronenreichen Granula aggregationsfördernde Stoffe frei. Durch Sekretion von Ca^{2+} , ADP, Thromboxan A2 und Serotonin kommt es zur Anlagerung weiterer Plättchen sowie zur Vasokonstriktion des Blutgefäßes [18]. Aus α -Granula werden weitere Gerinnungsfaktoren freigesetzt, wodurch die Gerinnungskaskade der sekundären Hämostase verstärkt wird. Einen weiteren Berührungspunkt primärer und sekundärer Hämostase stellt die Serinprotease Thrombin dar: Durch Abspaltung des N-

Terminus der Protease-aktivierten Rezeptoren 1 und 4 (PAR1, PAR4) kommt es zur Aktivierung des Rezeptors. Daraus resultiert unter anderem eine Sekretion aus Thrombozyten-Granula, was wiederum zur weiteren Plättchenaktivierung führt [19].

1.3 Sekundäre Hämostase

Um das beschädigte Endothel nachhaltig zu verschließen, ist die Beteiligung des Gerinnungssystems notwendig. Praktisch zeitgleich zur primären Hämostase wird die sekundäre Hämostase über zwei unterschiedliche Wege aktiviert: Die schnelle Aktivierung über den extrinsischen Weg und die langsamere Aktivierung über das intrinsische System. Der Start der Gerinnungskaskade des extrinsischen Systems beginnt mit der Freisetzung von Gewebefaktor (Faktor III, Tissue factor) aus dem Subendothel. Nach Aktivierung von Faktor VII kann unter Einfluss von Ca^{2+} die Aktivierung von Faktor X geschehen. In Anwesenheit von Ca^{2+} und Faktor V wird nun die Spaltung von Prothrombin zu Thrombin gefördert. Der Aktivierungsweg des intrinsischen Systems wird demgegenüber durch Oberflächenkontakt von Faktor XII gestartet, was über aktiviertes Kallikrein nochmals verstärkt wird. Über die Faktoren XI und IX kommt es zur Fortsetzung der Kaskade, die schließlich den zentralen Faktor X des Gerinnungssystems in die aktive Form überführt. Ebenso sind Ca^{2+} und Faktor VIII an der Umsetzung beteiligt, wodurch auch eine Beschleunigung der Reaktion ermöglicht wird. Beide Systeme laufen schließlich über Faktor X zusammen. Als Serinprotease ist das aktivierte Thrombin nun in der Lage, Fibrinogen zu spalten und damit zur Verknüpfung der Fibrinbestandteile untereinander beizutragen [18, 19].

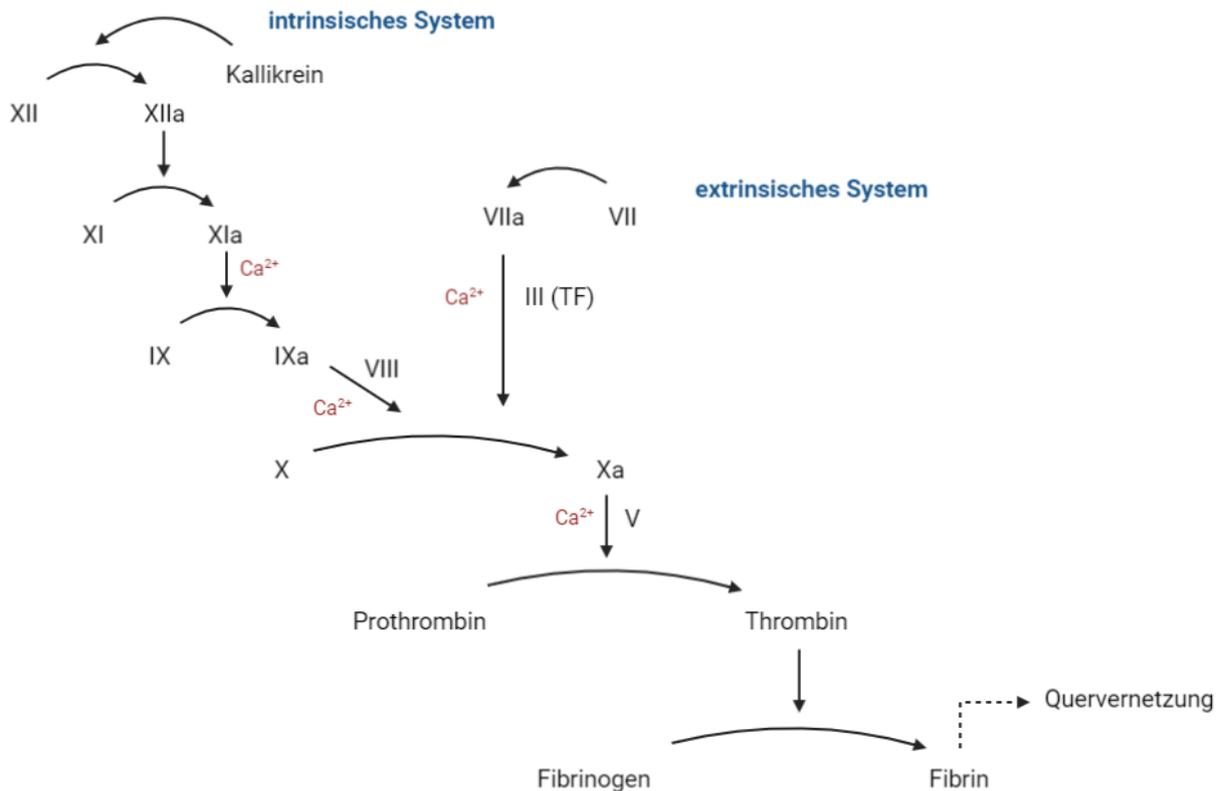


Abbildung 1: Schema der Gerinnungskaskade modifiziert nach [20]

Erstellt mit BioRender [<https://biorender.com/>]

1.4 Die Pathogenese der venösen Thrombose

Die Ursachen, die zu einer Entstehung einer tiefen Beinvenenthrombose führen, sind meist multifaktoriell und können sowohl erblich, als auch durch äußerliche Umstände bedingt sein [16]. Gemein sind der Entstehung von thrombotischen Ereignissen die auch noch heute gültige Virchow-Trias. Benannt nach dem Pathologen Rudolf Virchow, tragen drei Umstände maßgeblich zur Entstehung einer venösen Thrombose bei: Eine Schädigung des Endothels, eine Erhöhung der Blutviskosität sowie eine verlangsamte Strömungsgeschwindigkeit des Blutes [21].

In Abwesenheit von entzündlichen Prozessen setzt das intakte Endothel Stickstoffmonoxid sowie den Vasodilatator Prostaglandin I₂ frei. Beide Substanzen gelten als gefäßprotektive Faktoren, die zu einer Erweiterung der Blutgefäße führen. Nach Verlust oder Schädigung der inneren Gefäßwand sind zuvor inaktivierte Thrombozyten nun in der Lage, an die darunterliegende Zellschicht zu binden [22]. Über den GPIb-IX-V-Komplex und vWF wird der

erste Schritt der Plättchen-Anlagerung an das Subendothel eingeleitet, wodurch im weiteren Verlauf der extrinsische Weg der Gerinnungskaskade aktiviert wird [22]. Dieser Mechanismus scheint allerdings hauptsächlich auf die Ausbildung arterieller Thromben übertragbar zu sein, in denen Thrombozyten Hauptbestandteil arteriosklerotischer Plaques darstellen [23]. Tatsächlich wurden in einer Autopsie aus dem Jahre 1974 keine Anzeichen vorhandener Endothelschädigung in venösen Thromben festgestellt [24]. Zudem fanden sich insbesondere fibrinhaltige, erythrozytenreiche Bestandteile in den Thromben venöser Gefäße [22, 24]. Die überhöhte Aktivierung der Gerinnungskaskade ist im Falle der venösen Thrombose auf ein Zusammenspiel von Immunzellen und Thrombozyten zurückzuführen: Infolge einer Strömungsverlangsamung oder nach Einfluss pathogener, gewebsschädigender Stimuli kommt es zur Aktivierung von myeloischen Zellen [25]. Monozyten sind durch die Expression von Gewebefaktor (Faktor III, Tissue factor) im Stande, den extrinsischen Weg der Gerinnungskaskade zu aktivieren [22, 25]. Ebenso sind neutrophile Granulozyten durch Ausbildung von sogenannten NETs (neutrophile extrazelluläre Fallen) an der Aktivierungskaskade beteiligt. Thrombozyten wiederum fördern die Aktivierung neutrophiler Granulozyten und spielen selbst eine große Rolle bei der Aktivierung des intrinsischen Wegs. Schließlich sind stimulierte Endothelzellen durch Freisetzung von vWF und E-Selektin in der Lage, weitere Immunzellen zu binden und die Kaskade hierdurch zu verstärken [25].

1.5 Risikofaktoren

Neben erblichen Faktoren sind einige äußere Einflüsse bekannt, welche das Risiko einer venösen Thrombose erhöhen. Analog zu Virchow's Beobachtungen wird insbesondere Bewegungsmangel dazugezählt, was wiederum eine Stase des Blutes fördert [26]. Frauen besitzen ein dreifach höheres Risiko Thrombosen zu bilden, was durch die Einnahme oraler Kontrazeptiva oder durch den hormonellen Einfluss der Schwangerschaft nochmals ansteigt. Zurückzuführen ist dieser Unterschied unter anderem auf den Effekt von Estrogenen auf die Hämostase: Selbst unter physiologischen Bedingungen können weibliche Geschlechtshormone die Aktivität koagulatorischer Faktoren erhöhen. Hierzu zählen beispielsweise Fibrinogen, Faktor VII und Faktor X der Gerinnungskaskade [27, 28]. Auch bei Tumorerkrankungen kann eine erhöhte Thromboseneigung festgestellt werden. Dabei ist es entscheidend, welche Krebserkrankung vorliegt. Insbesondere bei bösartigen Erkrankungen

der Pankreas, des Magens oder des Hirns liegen thromboembolische Ereignisse gehäuft vor. Durch den Einsatz von Chemotherapie und unter antihormoneller Behandlung steigt das Risiko nochmals an [22]. Als genetische Prädisposition für die Ausbildung von Thrombosen gilt die Faktor-V-Leiden-Mutation. Durch eine Genmutation des Gerinnungsfaktors V kommt es zu einer sogenannten APC-Resistenz, wodurch es aufgrund fehlerhafter Ausschaltung von Faktor V durch Protein C zu einer erhöhten Aktivität des Gerinnungssystems kommt. Des Weiteren führt auch eine angeborene Prothrombinmutation 20210G>A zu einer erhöhten Thromboseneigung. Folglich kommt es zu einer überhöhten Produktion von Prothrombin (Faktor II), was wiederum eine pathologisch veränderte Blutgerinnung verursacht [16, 26]. Im Falle der Autoimmunerkrankung Antiphospholipid-Syndrom führt demgegenüber die Bindung von Autoantikörpern an körpereigene Phospholipide zu einem überaktiven Gerinnungssystem [16, 22].

2. Beteiligung des Immunsystems an der venösen Thrombose

2.1 Das Konzept der Immunothrombose

2.1.1 Definition

Nachdem ehemals angenommen wurde, dass Blutgerinnung und Immunsystem größtenteils unabhängig voneinander agieren, ist in den letzten Jahren das Konzept der Immunothrombose in den Fokus gerückt: Hierbei konnte der Einfluss der angeborenen Immunantwort auf thrombotische Prozesse festgestellt werden. Dieser Zusammenhang lässt sich letztlich auch auf physiologischer Ebene erklären und dient demnach der Unterstützung bei der Immunantwort. Die Hauptakteure in diesem entzündlichen Prozess stellen Thrombozyten, neutrophile Granulozyten sowie Monozyten dar [29]. Durch die Einwirkung des Immunsystems auf thrombotische Prozesse sollen Erreger gezielt abgefangen und eliminiert werden. Somit wird eine weitere Verbreitung von Pathogenen, die möglicherweise weitreichendere Folgen für den Wirt haben könnte, verhindert [25, 29, 30]. Eine überschießende, fehlgesteuerte Immunantwort auf das Infektionsgeschehen trägt allerdings entscheidend zur Ausbildung der hier beschriebenen pathogenen Gerinnungsprozesse bei.

Infolge der mangelhaften Durchblutung kann eine Unterversorgung der betroffenen Organe entstehen, die letztlich meist mit irreversiblen Gewebsschädigungen einhergeht.

2.1.2 Mechanismus

An dem Prozess der Immunothrombose sind einerseits Endothelzellen beteiligt, die nach Aktivierung P-Selektin aus Weibel-Palade-Körperchen freisetzen und so eine Adhäsion von Monozyten und neutrophilen Granulozyten fördern. Andererseits erfolgt zudem die Migration von Thrombozyten über das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ an den Ort der Entzündung [29]. Durch die Freisetzung von vWF aus Endothelzellen kommt es zu ihrer Bindung. Mittels Protein-Disulfid-Isomerase aus Thrombozyten und Endothelzellen wird die Aktivität von Gewebefaktor gefördert. Der von Monozyten freigesetzte Gewebefaktor (Tissue factor) fördert wiederum die Aktivierung des extrinsischen Systems der Gerinnungskaskade. Infolge eines pathogenen Stimulus kommt es zur Aktivierung von Neutrophilen, die daraufhin extrazelluläre Fallen (Neutrophil extracellular traps) absondern. Eine Plättchen-Neutrophilen-Interaktion wird über P-Selektin und PSGL1 (P-Selektin Glykoprotein Ligand 1) sowie über HMGB1 (High-Mobility-Group-Protein B1) ermöglicht [29, 31, 32]. Die Existenz von NETs in akuten, wie auch in chronischen Entzündungsprozessen ist hinreichend bekannt. Neben der Beteiligung in Autoimmunerkrankungen wie Psoriasis oder der rheumatoiden Arthritis konnten NETs insbesondere auch bei thrombotischen Ereignissen erfasst werden [33, 34]. Abgesehen von ihren antibakteriellen Eigenschaften spielen NETs demnach auch eine entscheidende Rolle bei den genannten Gerinnungsprozessen. Einerseits können sie durch Aktivierung von Faktor XII und Gewebefaktor das extrinsische System in Gang setzen, andererseits fördern sie die Plättchen-Migration durch vWF. Die in NETs enthaltenen Enzyme Neutrophile Elastase und Myeloperoxidase fördern zudem die Inaktivierung von Tissue-Factor-Pathway-Inhibitor (TFPI), was die Koagulation nochmals verstärkt [29].

2.1.3 Die prothrombotische Wirkung von Antikörpern und des Komplementsystems

In Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Antikörper in einigen Autoimmunerkrankungen eine prothrombotische Rolle einnehmen können. Dieser Zusammenhang kann insbesondere für das Antiphospholipidsyndrom sowie Lupus

erythematodes festgestellt werden [35-38]. Für die erhöhte Thromboseinzidenz wird im Falle vom Antiphospholipidsyndrom unter anderem eine vermehrte Expression von Gewebefaktor verantwortlich gemacht [39].

Es existieren auch zahlreiche Belege dafür, dass die Gefahr thrombotischer Ereignisse nach therapeutischer Verabreichung von Antikörperpräparaten steigt [40-43]. In diesem Zusammenhang konnte beispielsweise eine erhöhte Aktivität von Gerinnungsfaktor XIa festgestellt werden [40, 41].

Ebenso wurde eine Beteiligung des Komplementsystems am Vorgang der Immunothrombose beschrieben. Sowohl Komponenten des klassischen Wegs der Komplementkaskade, als auch Komponenten des alternativen Wegs können zu einer Aktivierung von Thrombozyten führen [44, 45]. Auf eine Freisetzung des C3-Komplements durch Thrombozyten nach Inkubation mit Influenza A-Viren konnte eine erhöhte NET-Bildung festgestellt werden. Die Entstehung von Komplexen aus Thrombozyten und Neutrophilen kann schließlich auch die Gefahr thrombotischer Ereignisse erhöhen [46]. Es finden sich vielerlei Belege für die wechselseitige Aktivierung von Komplement- und Gerinnungssystem. Beispielsweise konnte eine Aktivierung des extrinsischen Wegs der Gerinnungskaskade über den Komplementfaktor C5a nachgewiesen werden. Die Aktivierung beruht auf einer erhöhten Expression von Gewebefaktor in Endothelzellen und neutrophilen Granulozyten. Auf der anderen Seite ist beispielsweise auch Faktor XII in der Lage, den klassischen Weg des Komplementsystems anzutreiben [47]. Durch in-vitro-Versuche wurde gezeigt, dass die aktivierten Gerinnungsfaktoren X, XI und Plasmin eine Spaltung von C3 und C5 triggern können. Dieser Effekt konnte auch bei Thrombin festgestellt werden [48].

Auch im Rahmen neuester Erkenntnisse aus der medizinischen Forschung wird das Konzept der Immunothrombose nochmals aufgegriffen: Nach einer Infektion mit SARS-CoV-2 konnte bei Patienten, die einen schweren Infektionsverlauf erlitten, eine Überreaktion des Immunsystems mit folgender Organschädigung festgestellt werden. Mikrovaskuläre Thromben wurden sowohl in der Lunge als auch in den Nieren und im Herzen ermittelt. Auch hier konnte in den untersuchten Fibrinnetzwerken eine Beteiligung von NETs, Thrombozyten und des Komplementsystems verzeichnet werden [29, 49, 50]. Unter anderem wurde hierfür ein Endotheldefekt verantwortlich gemacht, was erhöhte Konzentrationen an vWF und somit eine Aktivierung der Gerinnungskaskade zur Folge hat [29, 50].

2.2 Das angeborene und das adaptive Immunsystem

Die Erregerabwehr des Immunsystems kann grundsätzlich in zwei Arten eingeteilt werden: Die unspezifische und die adaptive Immunabwehr. Die unspezifische Immunabwehr ist bereits genetisch determiniert und besteht aus zellulären sowie humoralen, löslichen Komponenten. Beim erworbenen Immunsystem wird die Immunantwort durch Ausbildung von Antikörpern auf das jeweilige Erregerspektrum hochspezifisch angepasst.

Als erster Schutzwall vor Erregern dienen Epithelzellverbände, die häufig von schützendem Schleim umgeben sind. Als zelluläre, unspezifische Abwehr sind neutrophile Granulozyten und Makrophagen in der Lage, Erreger durch Phagozytose zu eliminieren und so deren Verbreitung im Körper Einhalt zu gebieten. Sie bedienen sich verschiedener zytotoxischer Substanzen wie Stickstoffmonoxid, Hyperoxide oder Verdauungsenzyme, um Pathogene unschädlich zu machen. Dabei wird die zelluläre Abwehr jedoch selbst in Mitleidenschaft gezogen [51, 52]. Im Zuge des Entzündungsgeschehens trägt die Ausschüttung verschiedenster proinflammatorischer Zytokine zur Immunantwort bei. Makrophagen kommunizieren hierbei durch Sekretion von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukinen und Prostaglandinen mit weiteren Leukozyten [53, 54]. Auch das aus 20-30 Plasmaproteinen bestehende Komplementsystem unterstützt die angeborene Immunantwort und stellt eine Verbindung zum adaptiven Immunsystem her.

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem reagiert das adaptive Immunsystem langsamer, jedoch deutlich gezielter. Beteiligt sind an dieser gezielten Immunantwort insbesondere B- und T-Lymphozyten, die zunächst im Knochenmark und im Thymus heranreifen und über das Lymphsystem in die sekundären Lymphorgane gelangen [54]. Durch eine Vielzahl von Oberflächenrezeptoren auf diesen Zellen werden antigene Strukturen erkannt, was wiederum zur Proliferation der Lymphozyten führt. Ausdifferenzierte Plasmazellen, die aus B-Zellen hervorgegangen sind, sezernieren Antikörper und sind somit Teil der humoralen Immunantwort. Eine andere Differenzierung erfahren die T-Zellen, die nun zu zytotoxischen T-Zellen oder zu T-Helferzellen heranreifen [54].

2.3 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem umfasst eine Kaskadenreaktion proteolytischer Plasmaproteine und stellt eine Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem her. Nachdem früher angenommen wurde, dass das Komplementsystem ausschließlich Teil des angeborenen Immunsystems ist, ist heute bekannt, dass es B- und T-Lymphozyten bei der Immunantwort entscheidend unterstützt [55, 56]. Grundsätzlich werden drei verschiedene Wege unterschieden, auf denen das Komplementsystem aktiviert werden kann:

Der klassische Weg der Komplementkaskade wird durch IgG- oder IgM-Bindung an pathogene Strukturen aktiviert. Es kommt zur Anheftung des C1-Komplexes an das Fc-Fragment, bestehend aus den Glykoproteinen C1q, C1r und C1s. Es folgt die Spaltung von C4 und C2 zu C4bC2a, auch genannt C3-Konvertase. Die darauffolgende Spaltung zu C3a und C3b erfüllt zwei Funktionen: C3a fungiert als antiinflammatorisch wirksames Anaphylatoxin, wohingegen C3b der Opsonierung fremder Zellen dient [55, 56]. Es folgt die Bildung der beiden C5-Konvertasen (C3bBbC3b, C4bC2aC3b) und nach Spaltung von C5 die Herstellung des Membranangriffskomplexes (MAC, C5b-9). Der Komplex fñgt sich in die Zellmembran ein und bildet eine Pore, die schließlich zur Zellyse führt [55].

Die Aktivierung des alternativen Wegs der Komplementkaskade wird durch Oberflächenstrukturen auf Pathogenen induziert. Durch spontane Hydrolyse von C3 kann C3b an Faktor B binden, was wiederum dessen Spaltung fördert [55, 56]. Unter Einfluss von Faktor D kommt es zur Bildung der C3-Konvertase des alternativen Wegs C3bBb, die durch Properdin stabilisiert wird. Anschließend erfolgt die Bildung der C5-Konvertase [55, 56].

Die Kaskade des Lektin-Wegs wird durch Anlagerung von Mannose-bindendem Lektin (MBL) oder Fikolin an Pathogenoberflächen in Gang gesetzt. Analog zum C1-Komplex des klassischen Wegs komplexiert MBL mit MBL-assoziierten Serin-Proteasen-1, -2 und -3 (MASP). Hierdurch kommt es zu den gleichen Spaltungsreaktionen, die letztlich zur Bildung der C3- und C5-Konvertase führen [55, 56].

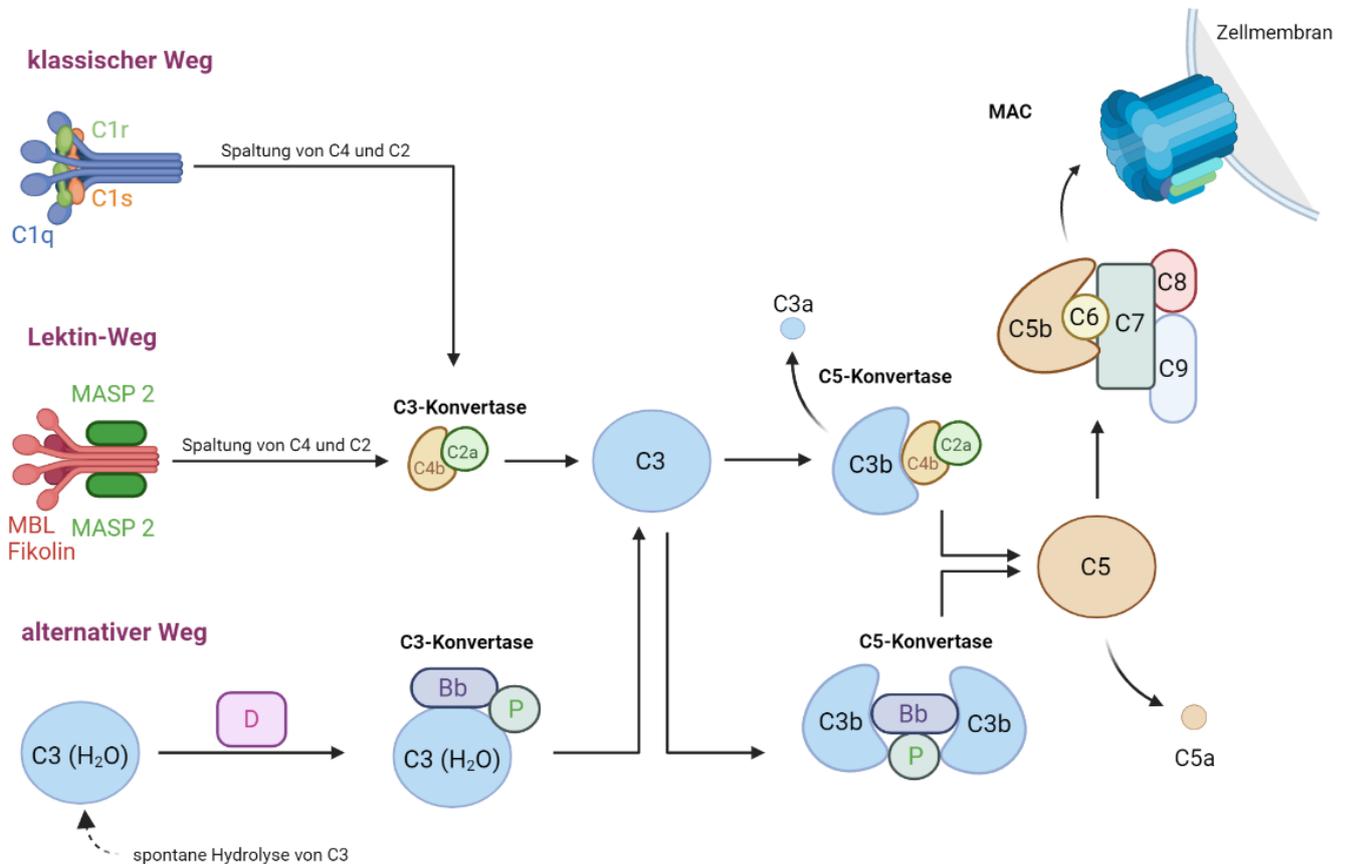


Abbildung 2: Schema der Komplementkaskade modifiziert nach [2]

Erstellt mit BioRender [<https://biorender.com/>]

2.4 Entwicklung und Reifung der B-Zellen

Benannt nach ihrem Entdeckungsort in der Bursa fabricii von Vögeln, sind gereifte B-Lymphozyten befähigt, Antikörper herzustellen und somit einen Beitrag zur humoralen Immunantwort zu leisten. Wie auch der myeloische Zweig der Hämatopoese entstammen B-Zellen ursprünglich von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark. Die weitere Entwicklung zu Pro-B-Zellen wird durch die Transkriptionsfaktoren PU.1, E2A und PAX5 (paired box protein 5) gefördert [57]. Es folgt eine Neuordnung der Gensequenzen, die für die schwere Kette kodieren. Nach erfolgter Umlagerung wird die schwere Kette als Bestandteil des Prä-B-Zellrezeptors ausgebildet. Die Bildung des Prä-B-Zellrezeptors gilt als Checkpoint im Reifeprozess einer B-Zelle, was zur Aussendung zellspezifischer Signale führt [58]. Ebenso kommt es unter dem Einfluss von IL-7 zur Neuordnung der Leicht-Ketten-Gensequenzen, worauf die Bildung der noch unreifen B-Zellen folgt. Zusammen mit der μ -Kette, den $Ig\alpha$ - und $Ig\beta$ - Untereinheiten wird nun auf der

Oberfläche der Zelle ein vollständiges IgM-Molekül (sIgM, surface IgM) exprimiert [57, 58]. In diesem Stadium liegt eine unreife B-Zelle vor, die jedoch noch dem Prinzip der zentralen Toleranz unterliegt. Hierbei wird auf Autoreaktivität des B-Zellrezeptors geprüft und entsprechend werden autoreaktive B-Zellen eliminiert [58]. Als translationale B-Zellen gehen sie nun vom Knochenmark ausgehend in den Blutkreislauf über. Sie unterliegen einem weiteren Differenzierungsmechanismus in der Milz, die man als periphere Toleranz bezeichnet. Nur Zellen, die keine Autoreaktion oder zumindest geringe Bindungstendenzen gegenüber dem Autoantigen aufweisen, entwickeln sich bis zur reifen B-Zelle. Zudem kommt es schließlich infolge des Reifeprozesses zur Ausbildung von sIgD (surface IgD) auf der Oberfläche der reifen B-Zelle [58].

2.5 Antikörperproduktion

Im letzten Abschnitt des Reifeprozesses von B-Zellen kommt es zur Entwicklung der antikörperproduzierenden Plasmazellen. Reife B-Zellen lassen sich nochmals in die drei Untergruppen folliculäre B-Zellen, Marginalzonen-B-Zellen und B1-Zellen einteilen. Folliculäre B-Zellen stellen den Großteil aller B-Zellen dar und finden sich in der Milz sowie in den Lymphknoten. Marginalzonen-B-Zellen (MZ-B-Zellen) finden sich ebenfalls in der Milz und bilden eine Begrenzung zwischen der weißen und roten Pulpa [59]. Im Peritoneal- und Pleuraraum befinden sich wiederum hauptsächlich B1-Zellen, die zusammen mit MZ-B-Zellen hauptsächlich T-Zell-unabhängig durch Antigene aktiviert werden [59, 60]. Im Unterschied dazu werden folliculäre B-Zellen hauptsächlich CD4⁺-T-Zell-abhängig aktiviert. Nachdem MZ-B-Zellen durch ein Antigen aktiviert wurden, kommt es zu ihrer Vermehrung in der Milz. Die hervorgehenden Plasmazellen sind bereits in der Lage, Antikörper mit begrenzter Lebensdauer zu bilden. Die kurzlebigen Plasmazellen produzieren für gewöhnlich IgM [60, 61]. Auch B1-Zellen sind im Stande, schnell auf Antigene zu reagieren und darauf Antikörper herzustellen. Sie werden vor allem durch bakterielle Pathogene aktiviert und sezernieren IgA über die Schleimhaut [59, 60, 62]. Folliculäre B-Zellen befinden sich nach Antigen-Aktivierung in den Keimzentren der Milz und der Lymphknoten, wo sie T-Zell-abhängig Gedächtnis-B-Zellen oder Plasmazellen ausbilden. In den Keimzentren unterliegen die B-Zellen dem Prinzip der somatischen Hypermutation, wodurch die Neuordnung von Genabschnitten zu einer erhöhten Affinität des gebildeten Antikörpers führt. Zusätzlich erfahren B-Zellen einen

Isotypenwechsel, der auch als Klassenwechsel bekannt ist. Hierbei können durch Änderung der konstanten Region der schweren Kette unterschiedliche Antikörperklassen gebildet werden [59, 60, 63]. In beiden Vorgängen ist das Enzym aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase (AID) beteiligt, die durch Abspaltung einer Aminofunktion von Cytosin Mutationen in einzelsträngige DNA einführt [1]. Durch diesen Vorgang wird der Reifeprozess von Antikörpern entscheidend vorangebracht. Die ausgebildeten Plasmazellen sind langlebiger und produzieren Antikörper mit hoher Affinität [59, 60]. Gedächtnis-B-Zellen können sich nach wiederholter Antigen-Exposition ebenso in antikörperproduzierende Plasmazellen entwickeln [59]. Im Vergleich zum ersten Antigenkontakt kann dabei die Zellzahl auf das bis zu Zehnfache ansteigen [60].

2.6 Antikörperstruktur und –funktion

Antikörper sind grundsätzlich aus vier Polypeptid-Einheiten aufgebaut, die nochmals in zwei schwere (H) und zwei leichte Ketten (L) eingeteilt werden. Die beiden Ketten sind jeweils identisch aufgebaut und untereinander mittels Disulfidbrücken verbunden. Die leichten Ketten des Antikörpers gehören entweder zum Isotyp λ oder κ und besitzen jeweils eine konstante und eine variable Domäne. Im Unterschied hierzu bestehen die schweren Ketten aus jeweils einer variablen und je nach Isotyp aus drei beziehungsweise vier konstanten Domänen [1, 64, 65]. Des Weiteren bilden die N-terminalen, variablen Domänen der leichten und der schweren Kette das antigenbindende Fab-Fragment aus. Das C-terminale Fc-Fragment wird wiederum durch die konstanten Domänen der schweren Kette ausgebildet. Es werden schließlich die fünf verschiedenen Isotypen IgG, IgM, IgA, IgD und IgE unterschieden, die sich durch Genvariationen im Fc-Fragment ergeben [1].

Das Fab-Fragment dient der Erkennung und Bindung verschiedenster antigener Strukturen, welche auch als Epitope bezeichnet werden. Über das Fc-Fragment wiederum werden zahlreiche Effektorfunktionen über Fc-Rezeptoren vermittelt [64, 65]. Hierzu zählen beispielsweise die Rezeptor-vermittelte Phagozytose, Sekretion proinflammatorischer Moleküle und Aktivierung des Komplementsystems [1, 65]. Auch die IgG-vermittelte Aktivierung von natürlichen Killerzellen und Monozyten unterstützt die Immunfunktion durch Eliminierung des gebundenen Antigens [1, 64, 66]. Interessanterweise sind Antikörper auch selbst in der Lage, Pathogene zu binden, diese zu neutralisieren und deren Verbreitung im

Wirt einzudämmen: Durch gezielte Bindung von Pathogenen wird deren Verbreitung auf den Ausgangspunkt der Infektion reduziert, wodurch die Ansteckungsgefahr weiterer Zellen vermindert wird [66]. Sowohl die Bindung von Pathogenen als auch der Eintritt in die Wirtszelle kann durch Antikörper gezielt verhindert werden. Im Falle eines Befalls der Wirtszelle können Antikörper in bestimmten Fällen auch intrazellulär agieren. Hierbei wird die Freisetzung, die Replikation oder die Expressierung pathogener DNA unterbunden [66].

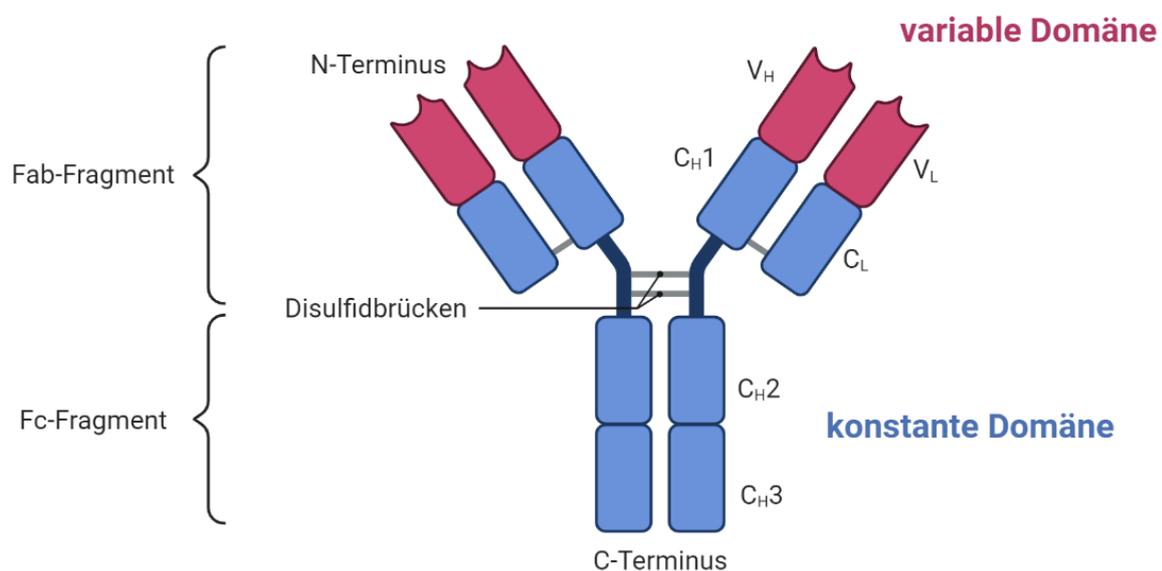


Abbildung 3: Schema eines monomeren Antikörpers modifiziert nach [1]

Erstellt mit BioRender [<https://biorender.com/>]

2.7 Das Immunglobulin A

2.7.1 IgA und die Beteiligung am mukosalen Immunsystem

Das mukosale Immunsystem umfasst eine Gesamtfläche von etwa 400 m² und stellt damit die größte Kontaktfläche der Außenwelt zum Immunsystem dar [67-69]. Da Immunglobulin A als der dominante Isotyp der Schleimhäute gilt, ist es nicht verwunderlich, dass IgA die zweithöchsten Serum-Konzentrationen aufweist [69, 70]. Das Immunsystem der Schleimhäute

umfasst unter anderem Verdauungs-, Atem- und Drüsengewebe, die allesamt mit schützendem Schleimhautepithel und einer Vielzahl an Immunzellen ausgestattet sind [67, 70]. Säuglinge erhalten einen ersten passiven Immunschutz über die antikörperhaltige Muttermilch, die vorwiegend mit Immunglobulin A ausgestattet ist. Dieser Vorgang ist abhängig vom mukosalen Adhäsionsmolekül MAdCAM-1 (mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1), welches im Brustgewebe zu finden ist und die Rekrutierung von Lymphozyten steuert [70, 71]. IgA übernimmt eine Vielzahl an Aufgaben, um das mukosale Immunsystem bei der Immunantwort zu unterstützen. Beschrieben werden IgA-vermittelte Mechanismen, in denen bakterielle als auch virale Pathogene direkt oder indirekt ausgeschaltet werden können. Tatsächlich konnte in in-vitro-Experimenten dargelegt werden, dass der direkte Kontakt des Zellüberstands von monoklonalem Human-IgA 95 % der zugesetzten Pneumokokken abtötet [67]. Normalerweise verhindert freigesetztes IgA das Eindringen von Pathogenen in die Epithelzellschicht. Hierbei ist es in der Lage, Pathogene zu binden und zu beseitigen. Bereits in die Epithelzelle eingedrungene Antigene werden über IgA innerhalb von Endosomen eliminiert. Zudem führt die Bindung von IgA-Antigen zur Produktion von IL-10 durch dendritische Zellen und damit zur Entzündungsreaktion. Hieraus wird deutlich, dass Immunglobulin A insbesondere das Eintreten von Pathogenen über die Schleimhäute verhindert, um somit das Risiko einer systemischen Infektion zu mindern [70].

2.7.2 Struktur

Wie alle anderen Immunglobuline besteht IgA klassischerweise aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten, die zusammen eine Y-förmige Polypeptidstruktur ausbilden [69]. Im Blut ist fast ausschließlich monomeres IgA (mIgA) zu finden, wohingegen das sekretorische IgA der Schleimhäute (sIgA) Polymere bildet. Die aus zwei monomeren IgA-Molekülen bestehenden Dimere kommen am häufigsten vor und sind durch eine J-Kette (joining chain) verbunden [69, 70]. Sekretorisches IgA besitzt eine zusätzliche Komponente (sekretorische Komponente - SC), die dem Schleimhauttransport dient und einen frühzeitigen enzymatischen Abbau verhindert [67, 69, 70, 72]. Die sekretorische Komponente besteht aus einer ca. 80 kD schweren Polypeptidkette und Kohlenhydratdomänen, die eine Bindung an Mucine der Schleimhaut fördern [67, 69, 70].

Das Immunglobulin kann als Isotyp IgA1 oder IgA2 vorliegen, die sich hauptsächlich hinsichtlich ihrer Sequenz in der Hinge-Region unterscheiden. So fällt die Hinge-Region von IgA1 im Vergleich zu IgA2 deutlich länger aus, wodurch sich auch strukturbedingt Unterschiede hinsichtlich ihrer Bindungskapazitäten ergeben: Die Pathogenbindung wird durch das im Blut vorherrschende IgA1 infolge der erweiterten Flexibilität der Fab-Fragmente verbessert [69, 70, 72]. IgA2 zeichnet sich wiederum durch eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber bakteriellen Proteasen aus [64, 70]. In Mäusen kommt nur ein Isotyp von IgA vor, welcher dem humanen IgA2 ähnelt [70]. Zudem kommt das humane IgA im Serum hauptsächlich als Monomer vor, wohingegen das IgA von Mäusen vor allem Polymere bildet [73].

2.7.3 Produktion und Sekretion von IgA

Sekretorisches IgA wird größtenteils von B2-Zellen aus den Keimzentren der Peyer-Plaques gebildet. Dieser Vorgang ist abhängig von folliculären T-Helferzellen. Etwa ein Viertel aller sIgA-Moleküle werden T-Zell-unabhängig von B1-Zellen produziert, die vor allem in Peritonealräumen zu finden sind [69, 70]. Der Isotypwechsel der B-Zellen wird über das Zytokin TGF- β (Transforming growth factor β) gesteuert. In der Lamina propria der Schleimhäute erfahren die B-Zellen den letzten Schritt der Differenzierung zu IgA-produzierenden Plasmazellen [70].

Für den IgA-Transport über das mukosale Epithel ist der polymerische Immunglobulin-Rezeptor (pIgR) verantwortlich. Hierbei bindet IgA an den basolateral orientierten pIgR und es kommt zur Aufnahme des Komplexes über das Endosom. Auf der gegenüberliegenden, apikalen Seite kommt es zur Spaltung des pIgR und IgA wird zusammen mit der sekretorischen Komponente als sIgA in das Lumen freigesetzt [67, 69, 70, 72].

2.7.4 IgA-Rezeptoren

Fc α RI stellt den wichtigsten, für IgA spezifischen Rezeptor dar. Er wird auch häufig synonym als CD89 bezeichnet. Das integrale Rezeptorprotein führt durch die Zellmembran durch und besteht aus zwei extrazellulären Domänen, einer transmembranen Domäne sowie einem im Zytoplasma befindlichen Teil [73, 74]. Bindung von Immunglobulin A erfolgt über die

extrazellulär gelegene EC1-Domäne [73-75]. Die Signalweitergabe nach Ligandenbindung erfolgt über die mit Fc α RI gekoppelte Fc γ -Domäne, die ein sogenanntes Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv (ITAM) enthält und die nachfolgenden Effektorfunktionen beeinflusst [73-75]. Fc α RI wird auf der Oberfläche einiger myeloischer Zellen wie Neutrophile, Eosinophile, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen ausgebildet [64, 73, 75]. Die Bildung des Rezeptors erfolgt auch in Abwesenheit von IgA, so konnte eine konstante Ausscheidung des sekretorischen Teils in in-vitro-Experimenten festgestellt werden [72]. Selbst bei Patienten, die einen Mangel an IgA aufweisen, werden die Rezeptoren auf der Oberfläche von myeloischen Zellen ausgebildet [74, 75]. Eine Beeinflussung der Fc α RI-Expression erfolgt durch bestimmte Moleküle, die vor allem mit Entzündungsreaktionen in Verbindung gebracht werden. Beispielsweise wird die Expression von Fc α RI auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen durch die Zytokine TNF- α sowie IL-1 β erhöht. Im Gegensatz zu PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) und bakteriellem LPS (Lipopolysaccharid), erfolgt durch polymeres IgA eine verminderte Fc α RI-Expression auf Monozyten und Makrophagen [75]. Die Fc α RI-Expression erhöht sich ebenfalls durch die Auswirkung von IL-8, TNF- α und Ionomycin auf neutrophile Granulozyten [75, 76]. Zudem wird durch den Einfluss der Zytokine IL-4 und IL-5 die Bindungstendenz von IgA an Fc α RI gefördert [75].

Ein weiterer Rezeptor, der neben IgA allerdings auch IgM bindet, wird als Fc α / μ R bezeichnet. Dieser Rezeptor findet sich auf murinen, reifen B-Zellen sowie auf Makrophagen und wird ebenfalls konstitutiv in den Lymphgeweben der Milz, der Lymphknoten und den Peyer-Plaques exprimiert [75, 77]. Es konnte unter anderem eine proinflammatorische Rolle von Fc α / μ R auf MZ-B-Zellen in einem Sepsis-Modell festgestellt werden [78]. Des Weiteren spielt der Rezeptor eine Rolle auf Ebene der ersten, frühen Immunantwort der B-Zellen [75, 77].

Der sogenannte Asialoglykoprotein-Rezeptor (ASGP-R) auf Hepatozyten steuert den Abbau von IgA und sorgt damit für ein Gleichgewicht der IgA-Konzentrationen im Blut [75]. Der Transferrin-Rezeptor der mesangialen Nierenzellen ist in der Lage, ausschließlich IgA1 zu binden [75, 79].

2.7.5 IgA-assoziierte Pathologien

Ein relativ häufiger Immundefekt stellt der selektive Mangel an IgA dar. Bei dieser Immunschwäche ist IgA im Serum teilweise nicht mehr nachweisbar, von einem selektiven IgA-Mangel spricht man allerdings bereits bei Werten unterhalb von 7 mg/dl. Die Werte für IgG sowie IgM befinden sich in der Regel im Normbereich [80]. Im Gegensatz zu anderen Immunschwächen sind die Konsequenzen des selektiven Mangels an IgA häufig harmloser Natur. Etwa 85-90 % der Patienten leben beschwerdefrei, einige entwickeln allerdings wiederkehrende Infektionen der oberen Atemwege oder des Verdauungstrakts. Auch Allergien, Atopien und Autoimmunkrankheiten können ausgebildet werden [70, 80]. Ein Grund für die nur geringfügige Beeinflussung des Immunsystems könnte die Kompensation von IgA durch IgM sein. Bei betroffenen Patienten wird die IgM-Produktion in der Darmschleimhaut hochreguliert und polymeres IgM kann alternativ über pIgR in das Lumen sezerniert werden. Eine Behebung des IgA-Mangels ist nicht möglich, die Therapie orientiert sich anhand der ausgebildeten Symptome [80].

Weitaus schwerwiegendere Folgen können jedoch auf IgA zurückzuführende Autoimmunerkrankungen haben. Bei der sogenannten Purpura Henoch-Schönlein handelt es sich um eine IgA-bedingte Vaskulitis, die zur Entzündung kleiner Gefäße der Haut, des Verdauungssystems, der Gelenke und der Niere führt. Für die Erkrankung wird der Isotyp Immunglobulin A1 verantwortlich gemacht. Neben IgA1 sind Neutrophile und das Komplementsystem am Entzündungsgeschehen beteiligt: Hierbei soll gegen Endothelzellen der Gefäßwände gerichtetes IgA1 die Freisetzung von IL-8 auslösen, was wiederum die Migration neutrophiler Granulozyten fördert. Neutrophile erfahren nun eine Aktivierung durch die Bindung von IgA1 an $Fc\alpha R1$, was die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bewirkt und den Vorgang der NETose fördert. Weitere Neutrophile werden durch Freisetzung von Leukotrien B4 (LTB4) an den Ort der Entzündung gelockt. Die Aktivierung von Endothelzellen erfolgt durch Freisetzung von TNF- α durch Neutrophile [11]. Es existieren einige Belege, die zusätzlich für eine Beteiligung des Komplementsystems sprechen. In Patienten, die Purpura Henoch-Schönlein und IgA-bedingte Nephritis entwickelt haben, konnten hochregulierte Faktoren des alternativen Wegs sowie des Lektin-Wegs festgestellt werden [11].

Bei der IgA-Nephropathie beschränkt sich die entzündliche Erkrankung auf die Glomeruli der Niere. Die hier vorgefundenen Immunkomplexe bestehen hauptsächlich aus IgA, C3-Komplementfaktor und teilweise IgG. Als Risikofaktoren werden erhöhte Werte an Gd-IgA1 (Galaktose-defizientes IgA1), Veränderungen des IgA-Rezeptors und eine Beteiligung des Komplementsystems gezählt [81].

Zu den Autoimmunerkrankungen wird ebenfalls die Zöliakie gezählt, welche durch eine Unverträglichkeit gegenüber Gluten charakterisiert ist. Die chronisch-entzündliche Erkrankung des Verdauungssystems betrifft insbesondere die Schleimhäute des Darms. Nach Absterben der Darmepithelien kommt es zur Malabsorption von Nährstoffen, was sich zusätzlich durch Durchfall und folglich kachektischen Zuständen äußern kann [82]. Verantwortlich für die Schleimhautschädigung sind Antikörper, die gegen das Enzym Transglutaminase 2 gerichtet sind [83]. Anti-TG2-Antikörper (IgA anti-tissue transglutaminase-2 antibody) konnten bei betroffenen Personen im Ösophagus, Magen, Duodenum und Rektum festgestellt werden [84].

Im Falle des Multiplen Myeloms können vermehrt thrombotische Ereignisse verzeichnet werden [6, 7, 85]. In einer Studie wurde festgestellt, dass eine verlängerte partielle Thromboplastinzeit (PTT) bei Patienten mit IgA-Myelom mit einer geringeren Überlebenszeit assoziiert ist [86]. Zudem wurde bei Patienten mit IgG-/IgA-MGUS (monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz) ein vierfach erhöhtes Thromboserisiko beschrieben [85]. Diese Ergebnisse deuten auf eine potentiell pathophysiologische Beteiligung des Immunglobulins A am Gerinnungssystem hin, dessen genauen Hintergründe bislang nicht bekannt sind.

2.7.6 IgA und das Komplementsystem

Es gibt zahlreiche Belege dafür, dass IgA in der Lage ist, das Komplementsystem zu aktivieren. Beispielsweise konnte im Serum von Patienten, bei denen IgA-Vaskulitis diagnostiziert wurde, eine Erhöhung der Komplementfaktoren C3a, C5a und Bb festgestellt werden. Da Faktor Bb nur aus Faktor B hervorgehen kann, geht man in diesem Fall von einer Beteiligung des alternativen Wegs des Komplementsystems aus [11]. Im Beispiel der IgA-Nephritis sind in Mesangialzellen Immunkomplexe bestehend aus IgA, C3, Properdin sowie Faktor H ermittelt worden. Dies spricht ebenfalls für eine Aktivierung des alternativen Wegs [14]. Ebenso konnte

eine Aktivierung des alternativen Wegs durch IgA mittels in-vitro-Experimenten überprüft werden [13, 14].

Auch eine Aktivierung des Lektin-Wegs durch den Einfluss von IgA wurde bereits untersucht: Innerhalb von in-vitro-Experimenten wurde die Bindung von polymerischem IgA an Mannose-bindenden Lektin bestätigt [14, 15]. Daraufhin folgte eine Aktivierung der Faktoren C3 und C4 [15]. In einer Studie wurde Nierengewebe von Patienten mit IgA-Nephritis auf Bestandteile des Lektin-Wegs untersucht. So konnten bei etwa einem Viertel der Proben Mannose-bindendes Lektin und MASP-1 (MBL-assoziierte Serin-Proteasen-1) detektiert werden [12, 14]. Die Beteiligung von IgA an der Aktivierung des klassischen Wegs spielt nach aktuellem Forschungsstand vermutlich nur eine untergeordnete Rolle [11, 14].

2.8 Zukünftige therapeutische Herausforderungen der Thrombosebehandlung

Um künftig eine umfassendere Behandlung thrombotischer Ereignisse infolge einer sterilen Inflammation zu gewährleisten, sind neue Therapieansätze gefragt. Bisher konzentrierten sich die gängigen Therapieoptionen hauptsächlich auf die Behandlung der Thrombose, wobei das eigentliche Entzündungsgeschehen in den Hintergrund gerät. Tatsächlich sind jedoch bei einigen antikoagulatorisch-wirkenden Arzneimitteln auch antiinflammatorische Effekte beobachtet worden. Beispielsweise führt Acetylsalicylsäure in höheren Dosierungen nach irreversibler Hemmung der Cyclooxygenase folglich zu einer verminderten Produktion von Prostaglandinen. In niedrigeren Dosierungen überwiegt die aggregationshemmende Wirkung [87]. Auch bei Inhibitoren des P2Y₁₂-Rezeptors, die den Effekt von ADP (Adenosindiphosphat) auf Thrombozyten hemmen, konnten antientzündliche Eigenschaften festgestellt werden [29]. Der antientzündliche Effekt von Heparin kann vermutlich auf eine verminderte NET-Bildung zurückgeführt werden. Diese Auswirkung von Heparin auf Neutrophile wurde sowohl in in-vivo- als auch in-vitro-Experimenten nachgewiesen [88].

In Anbetracht der Annahme, dass antiinflammatorische Therapieansätze einen positiven Zusatznutzen bei der Behandlung kardiologischer Erkrankungen haben können, wurden bereits erste Ergebnisse klinischer Studien veröffentlicht: Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Gabe des monoklonalen Antikörpers Canakinumab das Risiko eines Rezidivs

nach diagnostiziertem Myokardinfarkt signifikant erniedrigt. Bei den untersuchten Patienten wurden zuvor erhöhte Entzündungsparameter vorgefunden. Canakinumab ist gegen das Interleukin-1 β gerichtet und somit in der Lage, den CRP-Wert zu senken [29, 89]. Auch das Gichttherapeutikum Colchicin reduzierte das Risiko eines Erkrankungsrückfalls nach kürzlich erlittenem Herzinfarkt. Der Effekt kann vermutlich ebenfalls auf eine verminderte Ausbildung von NETs zurückgeführt werden [29, 90].

Künftig besteht auch die Herausforderung, neue Ansätze speziell zur Thrombosebehandlung zu entwickeln. Vielversprechend ist unter anderem der Ansatz, den prothrombotischen Effekt von HMGB1 und die darauffolgende Entzündungsreaktion zu unterbinden [29, 32, 91]. Auch die Inhibition des Komplementsystems ist Gegenstand aktueller Forschung. In naher Zukunft könnte die Entwicklung eines Komplementinhibitors der unterstützenden Thrombosebehandlung dienen [47, 52].

3. Multiples Myelom

3.1 Definition und Entstehung

Als Multiples Myelom wird eine maligne Erkrankung der antikörperproduzierenden Plasmazellen im Knochenmark bezeichnet, weshalb alternativ oft auch die Bezeichnung Plasmozytom verwendet wird. Die Erkrankung zeichnet sich durch eine krankhafte Anhäufung eines Plasmazellklons im Knochenmark aus, der somit monoklonale Antikörper produziert [3]. Die Antikörper sind ebenfalls im Serum und Urin nachzuweisen und können einem Isotyp IgG, IgA, IgM, IgD oder IgE zugeordnet werden [3, 92]. Die Ansammlung der malignen Plasmazellen äußert sich klassischerweise in Form von osteolytischen Läsionen der Knochenstruktur und damit verbundenen Frakturen sowie Knochenschmerzen [92, 93].

Die Myelomzellen betroffener Patienten gleichen langlebiger Knochenmark-Plasmazellen [5, 92]. Typischerweise exprimieren Myelomzellen CD138 (Syndecan-1) oder CD38 (zyklische ADP-Ribose-Hydrolase), wodurch eine Unterscheidung zu normalen Plasmazellen möglich ist [92, 94]. Sogenannte Translokationen, die zu einer Umänderung eines Genabschnittes innerhalb eines Chromosoms führen, zählen zu den frühen Ereignissen in der Entstehung des Multiplen Myeloms [3]. Als eine der häufigsten chromosomalen Aberrationen gilt die Translokation des IgH-Genlokus auf Chromosom 14q32, die in ca. 60 % der Fälle auftritt [92,

95]. In etwa 40-50 % der Fälle kann die Chromosomenaberration auf Trisomien der neoplastischen Zellen zurückgeführt werden. Eine Kombination aus beiden Phänomenen ist eher selten [5, 95].

3.2 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das Multiple Myelom macht etwa 1 % aller Krebserkrankungen aus und stellt nach Tumoren des Lymphsystems die häufigste Erkrankung des blutbildenden Systems dar [96-98]. In den Ländern Europas und Nordamerikas liegt die Erkrankungshäufigkeit bei etwa vier Fällen pro 100.000 Einwohner. In Deutschland erkranken ca. 3.500 Personen jährlich am Multiplen Myelom [3, 5]. Betroffene Personen erkranken typischerweise im höheren Lebensalter. Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Diagnose liegt bei 60-70 Jahren [3, 5]. Männer erkranken tendenziell häufiger als Frauen [3, 5, 95]. Zusätzlich kann beobachtet werden, dass Personen afrikanischer Herkunft etwa doppelt so häufig erkranken [4, 95]. In Asien findet sich im Vergleich dazu eine deutlich niedrigere Erkrankungshäufigkeit [5].

Es sind mittlerweile zahlreiche Faktoren bekannt, die das Erkrankungsrisiko fördern, jedoch kann bis heute keine eindeutige Genese des Multiplen Myeloms genannt werden [5]. Zu den Risikofaktoren zählen genetische Faktoren, Umwelteinflüsse sowie die individuelle Lebensweise. Diskutiert wird unter anderem eine familiäre Prädisposition, jedoch ist dieser Zusammenhang noch nicht vollständig aufgeklärt und bedarf weiterer Forschung [99, 100]. Es existieren Studien, die auf ein erhöhtes Erkrankungsrisiko infolge von genetischen Mutationen und Polymorphismen hinweisen. So könnte beispielsweise eine genetische Variation in der Promotorregion des Zytokins IL-10 die Entstehung des Multiplen Myeloms begünstigen [99, 101]. Wie bei den meisten anderen Krebserkrankungen konnte eine erhöhte Inzidenz bei Übergewicht festgestellt werden [99]. Zu den äußeren Einflüssen, die das Erkrankungsrisiko erhöhen können, zählen unter anderem bestimmte Pestizide, das Lösungsmittel Benzol sowie der Einfluss der Radioaktivität auf den Menschen [4, 99]. Auch Zusammenhänge zwischen viralen Infektionen wie dem Epstein-Barr-Virus und lymphoproliferativen Erkrankungen werden intensiv untersucht [102].

3.3 Diagnostische Kriterien

Klassischerweise dienen unter anderem die sogenannten CRAB-Kriterien der Sicherstellung der Diagnose des Multiplen Myeloms. Der Begriff *CRAB* ist hierbei aus dem Englischen übernommen worden und umfasst die Diagnosekriterien Hypercalcämie (*calcium*), Nierenversagen (*renal failure*), Anämie (*anemia*) und Knochenläsionen (*bone lesions*) [103].

Osteolytische Läsionen werden bei etwa 80 % aller Patienten festgestellt und sind verantwortlich für starke Knochenschmerzen [95]. Die Zerstörung der Knochenstruktur beruht auf einer erhöhten Osteoklastenaktivität in den von Myelomzellen befallenen Gebieten. Die Aktivierung der Osteoklasten erfolgt durch die Zytokine IL-6, IL-11, IL-1 β und TNF [93]. Um die Knochenläsionen festzustellen, bedient man sich häufig der Röntgendiagnostik, welche bei Bedarf durch Magnetresonanztomographie und Computertomographie erweitert werden kann [103]. Bei etwa einem Viertel der Betroffenen können infolge der fortgeschrittenen Knochendestruktion überhöhte Calcium-Werte im Serum festgestellt werden und zusätzlich die Nierenfunktion beeinträchtigen [3, 5]. Auch die Ablagerung von Leichtkettenprotein-Komplexen in der Niere kann zu einer verminderten renalen Filterleistung führen [3, 5]. Eine eingeschränkte renale Funktion betrifft etwa 20 % der Patienten und wird mithilfe der Kreatininclearance bestimmt [3, 5]. Von einer Niereninsuffizienz wird bei einer Kreatininclearance von weniger als 40 ml/min oder bei Serum-Kreatininwerten von mehr als 2 mg/dl ausgegangen [95]. Bei etwa der Hälfte aller Myelom-Patienten wird eine Blutarmut diagnostiziert. Eine Anämie liegt bei Hämoglobin-Werten unterhalb von 10 g/dl vor oder bei mehr als 2 g/dl negativer Abweichung vom jeweilig üblichen Referenzwert [5, 95]. Ursächlich für die Blutarmut sind eine verminderte Herstellung des Hormons Erythropoetin, die Ansammlung der monoklonalen Myelomzellen im Knochenmark und erhöhte Werte des Zytokins IL-6 [5]. Auch die Messung der monoklonalen Proteine im Serum und im Urin dienen der Diagnosestellung des Multiplen Myeloms [104]. Weitere prognostische Marker im Serum, die mit fortschreitender Erkrankung ansteigen, sind β_2 -Mikroglobulin, CRP (C-reaktives Protein) und LDH (Laktat-Dehydrogenase). Der Tumormarker β_2 -Mikroglobulin steigt bei erhöhtem Turnover der Myelomzellen an. Serum-Albumin wiederum sinkt mit fortschreitender Erkrankung und wird ebenfalls zur Diagnosestellung herangezogen [3, 5, 105].

3.4 Monoklonale Gammopathien und Paraprotein

Als monoklonale Gammopathien werden Erkrankungen bezeichnet, die infolge einer unregelmäßigen Vermehrung von Plasmazellen durch Herstellung monoklonaler Proteine gekennzeichnet sind [104, 106]. Unter anderem werden die beiden Erkrankungen monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz (MGUS) und das Multiple Myelom dazugezählt. Als MGUS wird eine gutartige Vorstufe einer malignen Gammopathie bezeichnet, die durch das Ausbleiben myelomartiger Symptome und einer geringen Plasmazellvermehrung gekennzeichnet ist [5, 107]. Das Risiko, eine maligne Erkrankung aus der Vorstufe MGUS zu entwickeln, liegt pro Jahr bei etwa 1 % [5]. Im Vergleich zum Multiplen Myelom liegen die Serum-Werte für monoklonales Protein im niedrigen Bereich: Für IgA liegt die Grenze bei 20 g/l, für IgG wiederum bei 35 g/l [3, 5]. Ab Serum-Werten von ca. 30 g/l an monoklonalem Protein ist eine Differentialdiagnose notwendig, um eine maligne Erkrankung auszuschließen [3, 104]. Trotz der Klassifizierung als symptomlose Vorerkrankung deuten einige Studien allerdings daraufhin, dass MGUS-Patienten bereits ein erhöhtes Frakturrisiko aufweisen [107].

Die monoklonalen Proteine werden auch als M-Proteine oder Paraproteine bezeichnet und leiten sich von den Immunglobulinklassen ab. Die Paraproteine bestehen aus zwei schweren und zwei leichten Ketten. Letztere können nochmals in κ - oder λ -Leichtketten eingeteilt werden [104]. Etwa 50-65 % aller Fälle werden dem IgG-Typ zugeordnet. Der zweithäufigste Typ leitet sich von IgA ab und umfasst ca. 20 % aller Fälle [4, 95]. Die restlichen Typen kommen deutlich weniger häufig vor [4]. Etwa jeder vierte Betroffene entwickelt ausschließlich Leichtketten vom Bence-Jones-Typ, welche im Urin nachgewiesen werden können und ein hohes Risiko für Nierenschädigungen bergen [3-5]. Bei einem sehr kleinen Teil aller Myelom-Patienten kann kein Paraprotein oder zumindest nur geringe Mengen im Serum festgestellt werden. Diese Form wird auch als nicht-sezernierendes Myelom bezeichnet [4, 105]. Ob sich diese Ausprägungsform tatsächlich positiv auf die Lebenserwartung der Patienten auswirkt, wird kontrovers diskutiert [105].

3.5 Behandlung des Multiplen Myeloms

Trotz stetigem Fortschritt in der medizinischen Forschung gilt die Erkrankung heute noch als unheilbar. Mithilfe modernster Therapieoptionen kann die mittlere Überlebenszeit jedoch auf bis zu fünf bis sieben Jahre angehoben werden. Die Prognose ist davon abhängig, zu welchem Zeitpunkt die Diagnose gestellt wird, wie hoch die Tumorlast ist und ob ein individuelles Ansprechen auf die Therapie gelingt [95]. Je nach Stadium wird eine Kombination aus klassischer Chemotherapie, Stammzelltherapie, Immunmodulation und Strahlentherapie erwogen.

Zur konventionellen Chemotherapie zählen hauptsächlich alkylierende Substanzen wie Melphalan, Cyclophosphamid, Nitrosoharnstoffe oder Anthrazykline, die die Myelomzellen an einer überhöhten Zellteilung hindern sollen [3, 5]. Klassischerweise erfolgt eine Kombination aus Alkylantien und Glucocorticoiden, so auch in der Kombinationsbehandlung aus Melphalan und Prednison. Die Behandlung mit Prednison eignet sich auch als Erhaltungstherapie und erwies sich als lebensverlängernd [5]. In den letzten Jahren hat sich auch die Therapie mit immunmodulierenden Substanzen etabliert. Hierzu zählen die Vertreter Thalidomid, Lenalidomid und Pomalidomid [3-5, 95]. Die Wirkungsweise beruht auf einer Aktivierung zytotoxischer T-Zellen, der Angiogenesehemmung und auf einer Förderung der Apoptose [5, 108]. Als weitere Wirkstoffgruppe in der Behandlung des Multiplen Myeloms haben sich die sogenannten Proteasominhibitoren etabliert. Vertreter wie Bortezomib oder Carfilzomib inhibieren katalytische Signalwege des 20S-Proteasomkomplexes, was schließlich zum Zelltod führt [95]. Auch die Entwicklung monoklonaler Antikörper zur Behandlung des Multiplen Myeloms hat zu einer Verbesserung der Therapie beigetragen. Der humane monoklonale Antikörper Daratumumab richtet sich gegen CD38-positive Myelomzellen, während der humanisierte IgG1-Antikörper Elotuzumab an das Oberflächenprotein SLAMF7 (signaling lymphocytic activation molecule) auf Myelomzellen bindet und dadurch NK-Zellen aktiviert [109, 110]. Zur vorbeugenden Behandlung von Wirbelkörperbrüchen werden häufig zusätzlich Bisphosphonate verabreicht [3, 5]. Eine Hochdosistherapie erfolgt meist in Kombination mit einer autologen Stammzelltherapie, bei der körpereigene Stammzellen transplantiert werden. Das Verfahren kann zu einer Verlängerung der Überlebenszeit führen [5, 95, 108]. Auch kann eine lokale Bestrahlung von pathologisch veränderten Knochenstrukturen durchaus effektiv sein und der unterstützenden Behandlung des Multiplen Myeloms dienen [3].

3.6 MOPC-Mausmodell

Ein bereits etabliertes Verfahren, das ein geeignetes Abbild der humanen Myelom-Erkrankung im Mausmodell ermöglichen soll, beruht auf i.v.-Injektionen der Zelllinie MOPC315.BM in BALB/c-Mäuse [111].

Bei der ursprünglichen Zelllinie MOPC315 handelt es sich um B-Lymphozyten aus BALB/c-Mäusen, welche sich auf Injektionen von Mineralöl zurückführen lassen und in den betroffenen Mäusen eine Plasmazellerkrankung -auch Plasmozytom genannt- auslösen. Die Autoren beschreiben hier, wie nach zweimaliger Subkultivierung die abweichende Zelllinie MOPC315.4 erzeugt wurde, welche sich nach subkutaner Injektion durch Ausbildung extramedullärer Plasmozytome auszeichnet. Um eine aggressivere und somit stärker krankheitsfördernde Unterart von MOPC315.4 zu erhalten, wurden von den Autoren 2.000.000 Zellen pro Maus intravenös appliziert und anschließend die Zellen vom Oberschenkelknochen einer darauffolgend querschnittsgelähmten Maus entnommen. Um schließlich die hier vorgestellte Zelllinie MOPC315.BM zu erhalten, wurde der soeben beschriebene Vorgang neun Mal durchgeführt. Die hier aufgeführte Zelllinie zeichnet sich somit im Vergleich zu anderen MOPC-Linien durch einen schneller fortschreitenden Krankheitsverlauf nach i.v.-Injektion aus.

Nach Injektion von 200.000 Zellen von MOPC315.BM pro Maus konnten die Verfasser bei allen Mäusen innerhalb von 30 Tagen Querschnittslähmung feststellen, was einer der vier Parameter zur Erfassung des humanen Endpunkts darstellte. Des Weiteren zählten hierzu eine Tumorgröße mit mindestens 1 cm Durchmesser, hervorstehendes Abdomen sowie Gewichtsverlust von mindestens 10 % nach Injektion. Nach Injektion der Zelllinie konnten in den betroffenen Versuchstieren die für das Multiple Myelom charakteristischen Knochenläsionen festgestellt werden. Mittels der Luciferase-markierten Zelllinie MOPC315.BM.Luc konnten nach Injektion die ausgehenden Biolumineszenzsignale genauer lokalisiert werden. Insbesondere die Knochenstruktur der Wirbelsäule und der Femora sind hierbei in Mitleidenschaft gezogen worden. Betroffene Tiere wiesen zudem erhöhte Calcium-Werte im Serum auf. In allen Versuchstieren konnten zudem Signale ausgehend von der Milz erfasst werden, welche sich folglich durch den Vorgang der extramedullären Hämatopoese vergrößerte. In allen querschnittsgelähmten Mäusen konnten somit Anzeichen von Splenomegalie verzeichnet werden.

Das Fortschreiten der Krankheit wurde ebenso anhand der Konzentration an IgA-Paraprotein im Serum der verwendeten Mäuse definiert, welche nach 10 Tagen post injectionem bei ca. 100 ng/ml lag. Auch das Biolumineszenzsignal korrelierte mit der IgA-Paraprotein-Konzentration und konnte ab 100 ng/ml als signifikant angenommen werden. Das von MOPC315.BM produzierte Paraprotein leitet sich von IgA λ 2 ab, was ebenso immunhistologisch im Knochenmark und der Milz belegt werden konnte [111]. Interessanterweise konnte außerdem der Myelom-typische Oberflächenmarker CD138 in hämatopoetischen Organen festgestellt werden [112].

3.7 Erhöhte Thrombosegefahr bei Patienten mit Multiplem Myelom

Bei Patienten mit Multiplem Myelom kann eine erhöhte Inzidenz thrombotischer Ereignisse verzeichnet werden. Verschiedene Studien kamen hierbei zu dem Ergebnis, dass das Risiko venöser Thrombosen insbesondere zu Beginn der Diagnose am größten ist. Eine der Studien spricht von einem 9-fach erhöhten Risiko im Vergleich zur Vergleichsgruppe, eine weitere Studie nennt ein 7,5-fach erhöhtes Risiko innerhalb eines Jahres nach Erstdiagnose [6, 7, 85]. Selbst bei der symptomlosen Vorerkrankung MGUS kann eine erhöhte Thromboseinzidenz festgestellt werden: Hierbei kann ein 3-fach höheres Risiko erfasst werden, welches ebenfalls im ersten Jahr sein Maximum erreicht [6, 7]. Auch scheint das Risiko für die Ausbildung arterieller Thrombosen in beiden Erkrankungsstadien anzusteigen, wenn auch weniger stark als das venöser thromboembolischer Erkrankungen [6, 85]. Die Ausbildung arterieller und venöser thrombotischer Ereignisse ist für die betroffenen Patienten insbesondere deshalb problematisch, da dies mit einer signifikanten Verringerung der Überlebenszeit einhergeht. Die Ausbildung venöser Thrombosen wird insbesondere in der frühen Phase der Erkrankung mit einer höheren Mortalität assoziiert. Nach Ablauf der ersten sechs Monate konnte im Anschluss kein Unterschied festgestellt werden [8].

3.8 Risikofaktoren für Thrombosen bei Patienten mit Multiplem Myelom

Die Ursachen für die Ausbildung von Thrombosen bei Patienten mit Multiplem Myelom sind breit gefächert und ergeben sich aus einem Zusammenspiel verschiedenster Faktoren. Grundsätzlich tragen drei Hauptfaktoren zu einer Erhöhung des Gesamtrisikos bei. Eingeteilt werden sie in klinische, krankheitsbedingte und behandlungsabhängige Faktoren [113].

Zu den erstgenannten gehören alle Risikofaktoren, die der Patient unabhängig von seiner Myelom-Erkrankung aufweist und die grundsätzlich für alle thrombotische Ereignisse gelten: Neben dem Alter und genetischer Prädisposition zählen hierzu auch vergangene medizinische Eingriffe, Immobilität, Operationen und die aktuelle Arzneimitteltherapie [6, 113, 114].

Krebserkrankungen an sich sind bereits mit einem 4- bis 5-fach erhöhten Thromboserisiko verbunden. Mit dem Fortschreiten der Krankheit und der Behandlung mit Chemotherapeutika steigt das Risiko zusätzlich weiter an [6]. Interessanterweise wiesen in einer Studie nur IgG- und IgA-MGUS-Patienten ein erhöhtes Thromboserisiko auf, wohingegen IgM-MGUS-Patienten davon unberührt blieben. Die biologischen Hintergründe, auf denen diese Unterschiede beruhen, sind zum jetzigen Zeitpunkt unbekannt [85, 114]. Die festgestellte Paraprotein-Konzentration hatte auf die Thromboseinzidenz in dieser Studie jedoch keinen Einfluss [85]. Zusätzlich konnten bei Patienten entzündungsfördernde Zytokine, vWF und Faktor VIII als prothrombotische Faktoren ausgemacht werden [6, 113-116]. In in-vitro-Experimenten konnte zudem festgestellt werden, dass das in Myelom-Patienten hochregulierte Zytokin IL-6 die Gerinnungskaskade über Fibrinogen, Gewebefaktor und Faktor VIII aktivieren kann [116]. Auch eine durch das Paraprotein verstärkte Plättchenadhäsion könnte zu den thrombotischen Ereignissen beitragen. Als weitere mögliche Ursache wird die Interaktion des Paraproteins mit Fibrin genannt, die zu einer veränderten Polymerisation von Fibrin und damit zu einem möglichen Gefäßverschluss führen könnte. Hierdurch würde sich zudem eine verminderte Fibrinolyse ergeben [113, 115, 116]. Es finden sich auch Hinweise dafür, dass Paraprotein eine prokoagulatorische Aktivität aufnehmen kann, wie es zum Beispiel bei Antiphospholipidantikörpern der Fall ist [113, 116]. In einigen Patienten scheinen auch Gerinnungsstörungen wie APC-Resistenz (aktiviertes Protein C) und verminderte Protein S-Konzentrationen eine Rolle zu spielen [113, 116].

Auch infolge der medikamentösen Therapie des Multiplen Myeloms kann das Thromboserisiko weiter ansteigen. Insbesondere die Verabreichung der Immunmodulatoren Thalidomid, Pomalidomid und Lenalidomid in Kombination mit weiteren Arzneistoffen wird mit einem höheren Thromboserisiko verbunden [6, 113]. In Kombination mit dem Glucocorticoid Dexamethason wird ein erhöhtes Risiko von bis zu 26 % beschrieben [113, 116]. Auch durch die Kombination von Thalidomid mit Alkylantien, Anthrazyklinen oder weiteren Chemotherapeutika wird die Gefahr von venösen Blutgerinnseln gesteigert [6]. Im Unterschied hierzu scheint die Gabe von Bortezomib eine protektive Rolle zu spielen, da die Thromboseinzidenz selbst bei einer kombinierten Verabreichung mit Immunmodulatoren gering ausfällt [6, 113]. Der genaue Mechanismus hinter der prokoagulatorischen Rolle der Immunmodulatoren ist nicht bekannt. Vermutet wird in diesem Zusammenhang eine prothrombotische Bedeutung von vWF, Faktor VIII und Gewebefaktor auf Endothelzellen. Ebenso ist Dexamethason in der Lage, die Konzentrationen von P-Selektin, vWF und Faktor VIII zu erhöhen [113].

3.9 Aktuelle Therapie der Thrombose und Problemstellung

Aktuell werden zur Thrombosebehandlung bei Myelom-Patienten die Wirkstoffe Acetylsalicylsäure, unfraktioniertes Heparin, niedermolekulares Heparin und Warfarin verwendet [115].

Insbesondere bei Patienten, die eine Therapie basierend auf einer Kombination aus Immunmodulatoren und weiterer Komedikation erhalten, sollte prophylaktisch eine Thrombosebehandlung durchgeführt werden. Zudem muss bedacht werden, dass patientenindividuelle Faktoren wie Immobilität, Infektionen oder Operationen einen zusätzlichen Einfluss auf das Thromboserisiko haben können [6].

Mittel der Wahl ist zunächst niedermolekulares Heparin, welches bei normaler Nierenfunktion empfohlen wird. Auch bei Patienten, bei denen eine Thrombozytopenie vorliegt, wird niedermolekulares Heparin bevorzugt. In diesem Fall sollte auf Warfarin verzichtet werden, um das Blutungsrisiko zu minimieren [6]. Der verstärkten Plättchenaktivität, die unter anderem auf den Effekt der Immunmodulatoren zurückzuführen ist, kann durch die Gabe von Acetylsalicylsäure effektiv entgegengewirkt werden [113]. In den letzten Jahren sind zudem

die sogenannten direkten oralen Antikoagulantien (DOAK) in den Fokus gerückt. Vertreter dieser Wirkstoffklasse haben neben der oralen Einnahme den Vorteil, dass ein Monitoring der Gerinnungsparameter nicht mehr notwendig ist [6, 113]. Ihre Rolle in der Thrombosebehandlung von Myelom-Patienten bedarf noch weiterer Untersuchungen.

Trotz der Annahme, dass die genannten Antikoagulantien zu einer effektiven Gerinnungshemmung führen, entwickeln 5-8 % aller Patienten dennoch thrombotische Ereignisse [114]. Somit minimieren die verwendeten Antikoagulantien die Gefahr von Thrombosen, jedoch bleibt ein Restrisiko stets bestehen. Ebenso problematisch ist die Tatsache, dass sich Myelom-Patienten einem höheren Blutungsrisiko ausgesetzt sehen. Auch hierfür kann meist keine einheitliche Ursache gefunden werden. Viel mehr ergibt sich die erhöhte Blutungsneigung aus einer Vielzahl an individuellen Faktoren. Hierzu zählen beispielsweise Operationen, Infektionen, veränderte Thrombozytenzahlen oder eine überschießende Gerinnungshemmung infolge der Therapie mit Antikoagulantien [114, 117]. Nach heutigem Stand der Forschung ist jedoch nicht von einer gerinnungshemmenden Eigenschaft des Paraproteins selbst auszugehen [117].

4. Zielsetzung

Da die Erkrankung des Multiplen Myeloms mit einer erhöhten Thrombosegefahr einhergeht und Antikörpern eine prothrombotische Rolle bei der Entstehung venöser Thrombosen zugesprochen wird, sollen im Rahmen dieses Projektes nun folgende Hypothesen überprüft werden:

1. IgA-Paraprotein ist für die vermehrte Ausbildung venöser Thrombosen verantwortlich.
2. IgA-Paraprotein beeinflusst die zelluläre Zusammensetzung venöser Thromben.

Im ersten Abschnitt des Projekts soll das MOPC-Mausmodell reproduziert und charakterisiert werden. Hierbei wird untersucht, ob eine Ansiedlung der Myelomzellen im Knochenmark

bestätigt werden kann. Anzeichen von Paraplegie nach Injektion von MOPC315.BM und MOPC315.36 stellen den sogenannten humanen Endpunkt und somit ein Abbruchkriterium des Versuchsaufbaus dar. Histologische Aufarbeitungen von Femora und der Wirbelsäulen sollen das Vorhandensein der Myelomzellen im Knochengewebe bestätigen. Allgemeine Erkrankungsparameter wie Gewichtsverlust, Anämie oder Anzeichen extramedullärer Hämatopoese sollen zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs miteinbezogen werden. Interessant ist hierbei, ob ein möglicher Zusammenhang zwischen der mittels ELISA bestimmten IgA-Paraprotein-Konzentration und einem Fortschreiten der Erkrankung bestätigt werden kann. Anhand eines Vergleichs der Blutbilder können mögliche Blutbildveränderungen detektiert werden, die mit einer fortgeschrittenen Erkrankung assoziiert werden. Ebenso dient die histologische Aufarbeitung von Mausgewebe der Modellbeschreibung. Hierzu werden ausgewählte Organe und Knochen entnommen und auf eine mögliche Tumordinfiltration untersucht. Eine Färbung von Femur, Wirbelsäule, Milz und Niere mittels Hämatoxylin und Eosin kann hierbei Aufschluss geben.

Ein potentieller Zusammenhang zwischen der erhöhten Thromboseinzidenz von Myelom-Patienten und einer Beteiligung des Immunsystems soll im zweiten Teil des Projektes anhand des Thrombosemodells (DVT-Operationsverfahren) sowie anhand von in-vitro-Experimenten untersucht werden. Vorausgehend konnte unsere Arbeitsgruppe bereits zur Aufdeckung der prothrombotischen Rolle von Antikörpern sowie des Komplementsystems in der Pathogenese der venösen Thrombose beitragen: Unter flussverlangsamenden Bedingungen wurde experimentell eine Bindung von IgM an Endothelzellen nachgewiesen, was infolgedessen zu deren Aktivierung führte. Ebenso wurde eine Beteiligung von IgG und eine Aktivierung der klassischen Komplementkaskade bestätigt. Dieser Schritt ist entscheidend für die nachfolgende Thrombusbildung, der eine Plättchenadhäsion, Leukozytenrekrutierung und NETose vorausgeht.

Eine Beteiligung von IgA an der Pathologie einiger entzündlicher Gefäßerkrankungen wurde bereits mehrfach bestätigt [118-121]. Als Ursache für das erhöhte Aufkommen venöser Thrombosen bei monoklonalen Gammopathien wird unter anderem die Bildung von Paraprotein diskutiert, jedoch konnte ein Zusammenhang bis heute noch nicht eindeutig belegt werden [116]. Mithilfe eines IgA-Paraprotein-produzierenden Mausmodells soll nun geklärt werden, ob IgA-Paraprotein einen prothrombotischen Einfluss auf das Thrombosemodell nimmt. Hierbei wird der ersten Versuchsgruppe aus BALB/c-Mäusen eine

Myelomzelllinie injiziert, die in-vivo zur Produktion von IgA-Paraprotein führt (MOPC315.BM). Der zweiten Versuchsgruppe wird wiederum eine Kontrollzelllinie injiziert, die zu keiner Paraprotein-Produktion führt (MOPC315.36). Nach anschließender Wartezeit und folgender Ligatur der Vena cava inferior werden das Thrombusgewicht und die Thromboseinzidenz von IgA-Paraprotein-sezernierenden BALB/c-Mäusen (injiziert mit MOPC315.BM) mit denen von nicht-sezernierenden BALB/c-Mäusen (injiziert mit MOPC315.36) ausgewertet.

Des Weiteren soll eine immunhistologische Aufarbeitung des Thrombusmaterials Aufschluss über die Zellzusammensetzung der Blutgerinnsel geben. Hierzu werden Thromben der MOPC315.BM- und MOPC315.36-injizierten BALB/c-Mäuse ausgewertet und mit Thromben unbehandelter BALB/c-Mäuse verglichen. Mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen soll die Verteilung der am Vorgang der Thrombose beteiligten Zelltypen analysiert und interpretiert werden. Da am Vorgang der Immunthrombose hauptsächlich Thrombozyten, neutrophile Granulozyten sowie Monozyten beteiligt sind, ist eine immunhistologische Erfassung dieser Zelltypen von besonderem Interesse [29].

Der potentiell prothrombotische Effekt des IgA-Paraproteins im Mausmodell soll innerhalb von in-vitro-Versuchen näher überprüft werden. Innerhalb von Aggregometrie-Experimenten wird die Thrombozytenaggregation unter dem Einfluss IgA-Paraprotein-haltiger Zellkulturüberstände untersucht. Neben dem Aggregationsausmaß wird eine Messung der ATP-Sekretion durchgeführt, um die Aktivierung der Thrombozyten beurteilen zu können. Eine mögliche Aktivierung von Neutrophilen durch den Einfluss von IgA-Paraprotein soll wiederum mithilfe von NETose-Experimenten analysiert werden. Hierbei sollen Neutrophile mit IgA-Paraprotein-haltigen Zellkulturüberständen inkubiert und die Freisetzung von NETs mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen ausgewertet werden.

III. Methoden

1. Versuchstiere

1.1 Die Maus als Tiermodell

Für das folgend vorgestellte Tiermodell wurden ausschließlich Mäuse als Versuchstiere verwendet. Als vergleichsweise kleines und leichtes Säugetier eignet sich die Maus hierfür besonders, da sie für die Forschung einige vorteilhafte Eigenschaften vereint: Die kurze Generationenfolge, die einfache und platzsparende Haltung in Käfigen und die Möglichkeit, auf Inzucht-Linien zurückgreifen zu können, die sich somit durch besonders reproduzierbare Versuchsergebnisse auszeichnen.

Auch bei den verwendeten Mäusen des Stammes BALB/cAnNRj (im Folgenden abgekürzt mit BALB/c) handelt es sich um einen sogenannten Inzuchtstamm: Hierbei werden die Tiere über mindestens 20 Generationen miteinander verpaart, um eine möglichst einheitliche Genetik als Voraussetzung zu schaffen. Im Falle der hier aufgeführten Mäuse handelt es sich um einen Unterstamm, der ursprünglich aus einem Albino-Auszuchtstamm -genannt BALB für Bagg's albino- entstand. 1935 wurde die F26-Generation vom amerikanischen Mausgenetiker George Davis Snell in das Jackson Laboratory nach Bar Harbor verbracht, die noch heute die Grundlage aller BALB/c-Unterstämme darstellt [122, 123].

In der biomedizinischen Wissenschaft werden BALB/c-Mäuse neben den Gebieten der Immunologie und der Herz-Kreislauf-Forschung hauptsächlich in der Krebsforschung zur Herstellung monoklonaler Antikörper verwendet. Dies beruht auf der Tatsache, dass die Mäuse nach Injektion von Mineralöl Plasmazelltumore -auch Plasmozytom genannt- ausbilden: eine Technik, die in den nachfolgenden Seiten dieser Arbeit noch umfassender beschrieben werden soll und eine wichtige Rolle zur Etablierung des hier verwendeten Tiermodells einnimmt [124].

1.2 Tierhaltung

Die Versuchstiere wurden regelmäßig über Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich, erworben, bevor sie der Tierhaltung des Walter-Brendel-Zentrums übergeben worden sind. Die Tierpfleger des Instituts versorgten die Tiere in regelmäßigen Abständen mit standardisierten Futterpellets sowie Wasser, das ad libitum zur Verfügung stand. Die Mäuse wurden streng geschlechterspezifisch getrennt und in Käfigen mit maximal vier Versuchstieren gehalten. In wöchentlichen Abständen wurden die Käfige durch das Fachpersonal gesäubert, das Einstreu gewechselt sowie neues Nistmaterial bereitgestellt. Zusätzlich wurde auf eine optimale Haltungstemperatur von 20-24°C und einer relativen Luftfeuchte von 50-70 % geachtet. Um den Tieren eine möglichst natürliche Lebensweise zu ermöglichen, wurde eine ausreichende Dunkelperiode gewährleistet, die der natürlichen circadianen Rhythmik entsprach. Täglich wurden die Mäuse auf ihr Allgemeinbefinden, Nahrungsaufnahme und Bewegungsaktivität untersucht.

2. Operative Eingriffe

2.1 Intravenöse Injektionen

Für die Vorbereitung der i.v.-Injektionen wurden zwei Zelllinien in Kultur gehalten und über mehrere Tage hinweg vermehrt: Die IgA-sezernierende Zelllinie MOPC315.BM und die nicht-sezernierende Zelllinie MOPC315.36. Letztere setzt weder von IgA-abgeleitetes Paraprotein noch andere Antikörper oder deren Fragmente frei [125].

Um ausreichend zeitlich flexibel zu bleiben, wurde die notwendige Anzahl an Versuchstieren bereits vor Versuchsbeginn in den OP-Bereich des Walter-Brendel-Zentrums verbracht und die Käfige auf Wärmepads gestellt, um eine Auskühlung der Tiere zu vermeiden. Vor den Injektionen wurde eine 1 ml-Spritze (Injekt-F Feindosierungsspritze, B. Braun SE, Melsungen), verbunden mittels 30 G-Kanüle (BD Microlance 3, Becton Dickinson GmbH, Franklin Lakes, USA), mit einem Schwanzvenenkatheter vorbereitet. In das gegenüberliegende Ende des etwa 10 cm langen Schwanzvenenkatheters (LDPE-Schlauch) wurde das entnommene Kanülenrohr einer 30 G-Kanüle eingeführt.

Die Zellkultur wurde in Suspensionsflaschen (Nunc EasYFlask 75 cm², Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gehalten und täglich auf Zellzahl, Zellform und Viabilität unter einem Lichtmikroskop untersucht. Insbesondere für den Tag der Injektion wurde auf eine ausreichende Konfluenz und auf eine einheitlich runde Zellform geachtet, um die Injektion von nicht-vermehrungsfähigen Zellen möglichst zu vermeiden. Am Tag der Injektion wurden zunächst 1-2 ml der Suspensionskultur entnommen und in ein Eppendorf Gefäß überführt, um eine Zellzählung vorzunehmen. Dies wurde mittels Zählkammer -auch Hämocytometer genannt- durchgeführt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die neue Zellkammer nach Neubauer (Neubauer improved Zählkammer, LO-Laboroptik Ltd, Lancing, UK) verwendet. Hierbei wurden wenige µl an Zellsuspension mit derselben Menge an Trypanblau-Lösung (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) vermischt und langsam resuspendiert. Anschließend wurde das benötigte Volumen an Zellsuspension für 5 Minuten bei 170 G, (Bremse 4, Beschleunigung 4) zentrifugiert (Centrifuge 5804, Eppendorf SE, Hamburg) und der Überstand vorsichtig verworfen. Für die i.v.-Injektionen wurden je nach Versuchsprotokoll jeweils 250.000 oder 500.000 Zellen pro Maus festgelegt. Anschließend wurde das verbleibende Pellet mit dem erforderlichen Volumen an sterilem PBS (DPBS 1x, Gibco, Waltham, USA) vorsichtig resuspendiert und vor Beginn der Injektionen bei 4°C kühl gehalten. Hierbei wurde grundsätzlich eine größere Menge an Injektionssuspension angesetzt, um eventuelle Verluste während des Injektionsvorgangs auszugleichen. Nun wurden die Mäuse im OP-Bereich des Walter-Brendel-Zentrums für die Schwanzveneninjektion vorbereitet: Hierbei wurden die Mäuse zunächst in einem sogenannten Restrainer fixiert, um freien Zugang auf den Schwanzbereich zu erhalten. Anschließend wurde ein Handschuh mit ca. 40°C warmen Wasser befüllt und das Ende verknotet. Der Schwanzbereich der Maus wurde somit für einige Sekunden erwärmt, um eine Dilatation der Schwanzvenen zu erreichen, die schließlich durch eine hervortretende rötliche Färbung zu erkennen waren. Die i.v.-Injektionen wurden nun über die lateralen Schwanzvenen vorgenommen. Dabei wurde 1 ml der Zellsuspension vorsichtig in eine Spritze (Injekt-F Feindosierungsspritze, B. Braun SE, Melsungen) überführt, die restliche Luft in der Spritze langsam entfernt und anschließend mit dem vorbereiteten Schwanzvenenkatheter verbunden. Anschließend wurde das gesamte System nochmals auf Luftblasen überprüft, um das Risiko einer Luftembolie nach Injektion zu minimieren. Auch das Prüfen auf undichte Stellen des Systems war vor und während der Schwanzveneninjektion Teil der Kontrollprozedur. Der Schwanz wurde nun mittels Zeige- und Mittelfinger am

körpernahen Ende festgehalten und der darunterliegende Bereich mit Daumen sowie Ringfinger der linken Hand vorsichtig fixiert. Die Punktion wurde mithilfe eines Nadelhalters in der rechten Hand durchgeführt, wodurch es möglich war, die Kanüle des Katheters vorsichtig in die Schwanzvene einzuführen. Nach erfolgreichem Einführen der Kanüle wurden langsam 150 µl der Zellsuspension pro Maus injiziert und anschließend einige Sekunden gewartet, bis die Kanüle schließlich wieder entfernt wurde. Ein gutes Indiz für eine erfolgreiche Injektion war es, wenn bei Eintritt der Kanüle wenige µl venöses Blut aus der Einstichstelle zurück in das Kathetersystem flossen. Die an das Kathetersystem verbundene Kanüle wurde regelmäßig nach jedem Versuchstier gewechselt. Nach erfolgter Punktion der Mäuse wurde austretendes Blut an der Einstichstelle vorsichtig entfernt und die Tiere zurück in die Käfige gebracht.

Nach Injektion der jeweiligen Zelllinie wurden die Mäuse jeden Tag auf ihren Allgemeinzustand überprüft, um mögliche Veränderungen des Krankheitsverlaufs besser erfassen zu können. Je nach Versuchsprotokoll betrug die Wartezeit post injectionem zwischen 10 Tagen und 6 Wochen. Hierbei wurde insbesondere auf Krankheitszeichen wie beginnende Querschnittslähmung und Gewichtsverlust geachtet. Tiere, die nach Injektion augenscheinlich einen zu schwachen Allgemeinzustand aufwiesen, wurden für die darauffolgende Operation nicht mehr verwendet und aus dem Versuch genommen.

2.2 DVT-Operationsverfahren: Mausmodell der venösen Thrombose

2.2.1 Grundlegendes

Im folgenden Abschnitt soll das verwendete Maus-Modell zur Induktion einer venösen Thrombose durch Ligatur der unteren Hohlvene vorgestellt werden.

Die sogenannte Vena cava inferior (IVC) erhält von kaudaler Seite aus Zuflüsse aus den beiden Venae iliacae communes, durchläuft das Zwerchfell und transportiert sauerstoffarmes Blut aus der unteren Körperhälfte in das rechte Atrium des Herzens. Ebenso leitet die obere

Hohlvene -auch Vena cava superior genannt- sauerstoffarmes Blut aus der oberen Körperhälfte in den rechten Vorhof des Herzens.

2.2.2 Versuchsvorbereitung

Zur Vorbereitung des chirurgischen Eingriffs sind zunächst alle zu operierenden Tiere in den OP-Bereich des Walter-Brendel-Zentrums verbracht und die Käfige auf Wärmepads gestellt worden, um eine Auskühlung der Tiere zu verhindern. Zunächst wurde der Operationsbereich vorbereitet und alle chirurgischen Materialien bereitgestellt sowie desinfiziert. Das Lichtmikroskop wurde wenige Minuten vor Beginn des Eingriffs auf Funktionstüchtigkeit überprüft und die darunterliegende Wärmeplatte auf Körpertemperatur eingestellt. Die Wärmeplatte, die zugleich als beheizbarer OP-Tisch diente, wurde mit Aluminiumfolie ausgekleidet, um eine gleichmäßige Wärmeverteilung zu ermöglichen. Für die Tiere wurde eine Kopfkammer vorbereitet, in die eine Mischung aus Sauerstoff und Isofluran (Forene, Abbott GmbH, Wiesbaden) geleitet wurde, um jederzeit eine Vollnarkose gewährleisten zu können. Fixiert wurden die an die Kopfkammer verbundenen Kunststoffschläuche mittels Klebebands an die Wärmeplatte. Ebenso wurden die für den chirurgischen Eingriff notwendigen Bedarfsmaterialien bereitgestellt. Hierzu gehörten Wattestäbchen, eine 2 ml-Spritze (B. Braun, Melsungen), sterile Kochsalzlösung (Isotonische Kochsalzlösung, B. Braun, Melsungen), sterile Wundauflagen, Haarentfernungscreme (Asid-Med, Asid Bonz GmbH, Herrenberg) sowie Wunddesinfektionsmittel (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt).

2.2.3 Pharmakologie

Um die Versuchstiere in den Zustand der Narkose zu versetzen, bediente man sich mehrerer Anästhetika. Diese werden wiederum in Inhalations- und Injektionsanästhetika eingeteilt.

Als Inhalationsanästhetika bezeichnet man im Allgemeinen Arzneistoffe, die aufgrund ihrer Flüchtigkeit über das respiratorische System aufgenommen werden und der Narkoseeinleitung dienen. Ebenso soll hierdurch ein frühzeitiges Erwachen der Versuchstiere vermieden werden.

Narkoseeinleitung

Als flüssiges Inhalationsanästhetikum wurde Isofluran (Forene, Abbott GmbH, Wiesbaden) verwendet, was durch den Vernebler des Narkoseapparats zunächst in den Gaszustand überführt werden musste. Als Trägergas diente Sauerstoff. Isofluran gehört zur Gruppe der halogenierten Ether, die sich durch eine hohe hypnotische und muskelrelaxierende Wirkung auszeichnen. Aufgrund ihrer geringen analgetischen Potenz werden sie meist mit weiteren Injektionsanästhetika kombiniert. Als potentieller Wirkmechanismus wird eine Hemmung von GABA-, Glycin- und NMDA-Rezeptoren diskutiert [126].

Injektionsanästhetika können wiederum in Hypnotika, Sedativa und Analgetika eingeteilt werden. Im Unterschied zu Injektionsanästhetika erfolgt die Verabreichung intravenös, intraperitoneal oder subkutan. Um Einzeldosierungen zu vermindern und um somit ein günstigeres Nebenwirkungsprofil zu erhalten, wurden drei verschiedene Substanzen zu einer Kombinationsanästhesie vereint: Bestehend aus Midazolam (Midazolam, B. Braun SE, Melsungen), Medetomidin (Dorbene vet., Zoetis Deutschland GmbH, Berlin) und Fentanyl (Fentadon, Albrecht GmbH, Aulendorf) konnte hierbei eine sich gegenseitig ergänzende Arzneistoffmischung zur Injektion verwendet werden [127].

Bei Midazolam handelt es sich klassischerweise um ein Benzodiazepin, dessen Wirkung sich auf allosterische Modulation des GABA_A-Rezeptors zurückführen lässt. Durch die darauffolgend verminderte Erregbarkeit der Nervenzelle, ergeben sich mehrere für den operativen Eingriff erwünschte Wirkungen. Im Allgemeinen führen Benzodiazepine zur Muskelrelaxation, zur Sedierung und Anxiolyse.

Medetomidin wiederum ist ein sogenannter α_2 -Adrenozeptoragonist, welcher seine antisymphathikotone Wirkung durch Hemmung weiterer Noradrenalin-Freisetzung entfaltet. Die Substanz wird vor allem aufgrund des sedativen, muskelrelaxierenden und leicht analgetischen Effekts angewendet.

Als dritte Wirkkomponente wurde das synthetische Opioid Fentanyl genutzt. Der Agonist des μ -Opioidrezeptors zeichnet sich durch eine hohe analgetische Potenz aus. Jedoch birgt die Gabe auch immer die Gefahr einer potentiellen Ausbildung einer Atemdepression. Aus diesem

Grund wurden die Versuchstiere nach Injektion streng überwacht und bei Atemproblemen wurde frühzeitig eingegriffen. Die Wirkdauer nach Injektion beträgt ca. 30 Minuten.

Eine halbe Stunde vor Beendigung des chirurgischen Eingriffs wurde Buprenorphin subkutan verabreicht. Der partielle Agonist des μ -Opioidrezeptors wurde aufgrund einer maximalen Wirkungsdauer von zwölf Stunden insgesamt drei Mal verabreicht. Das starke Schmerzmittel wird hauptsächlich postoperativ eingesetzt, zusätzlich tritt eine sedative Wirkung bereits 15 Minuten nach Applikation ein [128].

Narkoseausleitung

Der Effekt von Medetomidin konnte nach Beendigung des Eingriffs durch die Gabe von Atipamezol (Alzane, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin) antagonisiert werden. Der α_2 -Antagonist wird ausschließlich in der Veterinärmedizin verwendet und dient dem beschleunigten Aufwachen nach beendeter OP. Nach Verabreichung von Atipamezol ist grundsätzlich eine Übererregbarkeit des Tieres möglich, weshalb eine engmaschige Kontrolle des Allgemeinzustands durchgeführt wurde.

Um den Effekt von Midazolam aufzuheben, wurde zusätzlich Flumazenil (Hikma Pharma GmbH, Gräfeling) verabreicht. Der kompetitive Antagonist des GABA_A-Rezeptors konkurriert um dieselbe Bindungsstelle wie die Vertreter der Benzodiazepine.

2.2.4 Narkoseeinleitung und Narkoseaufrechterhaltung

Um den folgenden chirurgischen Eingriff durchführen zu können, wird eine sogenannte Allgemeinanästhesie vollzogen. Dies ist insbesondere dann notwendig, wenn ein Eingriff unter Bewegungs- und Schmerzlosigkeit durchgeführt werden soll. Hierbei soll durch die Gabe eines oder mehrerer Anästhetika eine Hypnose, Analgesie sowie Relaxation des zu operierenden Tieres herbeigeführt werden. Um die Narkose einzuleiten und um mögliche Stressfaktoren für das Tier zu minimieren, wurde zunächst die Inhalationsnarkose durchgeführt. Diese zeichnet sich durch eine schnelle Anflutung des Narkotikums aus und dient der kurzzeitigen Sedierung der Tiere. Hierbei wurde die Maus in eine Narkosebox befördert, in die anschließend 5,0 Vol. % Isofluran (Forene, Abbott GmbH, Wiesbaden) und 0,35 l/l Sauerstoff zugeführt wurde. Nach wenigen Sekunden wurde die sedierte Maus aus der Box entnommen und die Narkose durch

eine intraperitoneale Injektion fortgeführt. Bei der Injektionsnarkose wurde die bewährte Mischung aus Medetomidin (0,5 mg/kg KG), Midazolam (5,0 mg/kg KG) und Fentanyl (0,05 mg/kg KG) injiziert [129]. Anschließend wurde die nun narkotisierte Maus auf die vorbereitete Wärmeplatte gelegt, wobei die Schnauze in die Kopfkammer ragte. Die Narkose wurde durch Isofluran-Sauerstoff-Mischung intensiviert und vor Beginn des chirurgischen Eingriffs über den Zwischenzehenreflex kontrolliert. Bedarfsweise wurde bei unzureichender Narkosetiefe alle 30 Minuten die Injektionsnarkose durch subkutane Injektion in halber Dosierung fortgeführt. Die Operation wurde im chirurgischen Toleranzstadium durchgeführt, was dem Stadium III₂ der Narkosestadien entspricht. Dieses Stadium ist gekennzeichnet durch Bewusstseinsverlust, flacher Atmung und einer deutlich verminderten Reaktion auf chirurgische Stimuli. Neben der Überprüfung der Reflexe wurde während der OP auch die Atmung kontrolliert.

2.2.5 Freilegung und Ligatur der Vena cava inferior

Für den chirurgischen Eingriff wurde zunächst das Fell im Bereich des Abdomens mittels Rasierer gekürzt und daraufhin eine erbsengroße Menge an Haarentfernungscreme (Asid-Med Entthaarungscreme, Asid-Bonz GmbH, Herrenberg) aufgetragen. Zur Befeuchtung der Augen wurde in der Zwischenzeit eine Salbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer AG, Leverkusen) appliziert und bedarfsweise während der OP erneuert. Nach mehrminütiger Einwirkzeit wurde die Haarentfernungscreme sowie die restlichen Haare vorsichtig mithilfe eines Wattestäbchens entfernt. Zu Beginn des chirurgischen Verfahrens wurde nochmals der Zwischenzehenreflex kontrolliert und der zu operierende Bereich desinfiziert. Daraufhin wurde das Abdomen über einen Bauchschnitt median eröffnet, sodass die Linea Alba der Bauchwand zu erkennen war. Der zweite Schnitt erfolgte nun über den nur schwach durchbluteten Sehnenstreifen, was nun eine Auslagerung des darunterliegenden Darmgekröses ermöglichte. Die ausgelagerten Eingeweide wurden mit steriler Wundaufgabe ausgekleidet und während der OP mit steriler isotonischer Kochsalzlösung feucht gehalten. Dieses Vorgehen ermöglichte nun die Sicht auf das Operationsfenster und somit auf die Vena cava inferior. Mittels gerader Pinzetten wurde die Vene nun vorsichtig vom umliegenden Gewebe befreit und insbesondere von der Aorta abdominalis separiert [130]. Hierbei wurde stets darauf geachtet, umliegende Gefäße nicht zu verletzen. Bei kleineren Verletzungen wurde die Blutung mittels Wattestäbchen gestillt. Daraufhin erfolgte die Freilegung eines

Durchgangs, der unterhalb der Vena cava inferior verlief. Als Orientierungspunkt galt die Abzweigung der Vena renalis sinistra, unterhalb derer die Aushöhlung eingeleitet und eine Verbindung mit der gegenüberliegenden Seite geschaffen wurde. Anschließend wurde ein Prolene 8-0 Faden unterhalb der Vene durchgezogen, sodass der Faden oben an das Gefäß anliegend doppelt verknotet werden konnte. Zwischen Gefäß und Faden wurde ein ca. 2-3 mm langer Metalldraht als Platzhalter vorgelegt, um den schließlich der dritte Knoten gebunden wurde. Nach Entfernung des Platzhalters und dem beidseitigen Kürzen des Fadens war die Ligatur vollständig. Die Baueingeweide wurden rückgelagert und die Bauchwand per kontinuierlicher Naht verschlossen. Beim Vernähen der Haut wurde eine Einzelknopfnah angewandt. Die nun verschlossene Haut des Abdomens wurde im Anschluss mit Iodtinktur betupft, um das Risiko einer Wundinfektion zu vermindern.

2.2.6 Erwachen aus der Narkose und Postanalgesie

30 Minuten vor geplantem Erwachen der Versuchstiere wurde 0,1 mg/kg KG Buprenorphin s.c. injiziert. Nach Abschluss der Operation wurde die Narkose mit einer Mischung aus Atipamezol (2,5 mg/kg KG) und Flumazenil (0,5 mg/kg KG) beendet [129]. Infolge der postoperativen Belastung wurden den Versuchstieren 6-8 Stunden nach dem Eingriff eine weitere Dosis an Buprenorphin subkutan injiziert. Die letzte Gabe an Buprenorphin erfolgte schließlich 12 Stunden darauf am Folgetag. Ebenso war eine engmaschige Kontrolle des Allgemeinzustands und die Dokumentation in Überwachungsbögen Teil der postoperativen Versorgung.

2.2.7 Beendigung des Versuchs und intrakardiale Blutentnahme

Im Anschluss wurde der Versuch 24 Stunden nach Operation beendet: Hierbei wurde die Maus nochmals in Narkose versetzt, bis diese das Toleranzstadium erreichte und keinen Zwischenzehenreflex mehr aufwies.

Zur Vorbereitung einer intrakardialen Blutentnahme wurde die narkotisierte Maus auf den Rücken gelagert und nochmals auf Reflexe geprüft. Für die Entnahme wurde eine 2 ml-Spritze mit 27 G-Kanüle vorbereitet. Für die Gewinnung von Plasma wurden 100 µl Citratlösung (S-

Monovetten, Sarstedt, Nümbrecht) in den Konus der Spritze vorgelegt. Je nach Versuchsprotokoll wurde auf die Zugabe eines Antikoagulans verzichtet, um Serum zu gewinnen. Im Bereich des Sternums wurde nun die Haut mittels chirurgischer Schere entfernt, um auf die darunterliegenden oberen Rippenbögen einsehen zu können. Die Punktion erfolgte nun mit leicht geneigter Spritze im Winkel von ca. 30-45° in den zweiten Zwischenrippenraum. Nach vorsichtiger Aspiration wurde diese Position beibehalten, bis ca. 1 – 1,5 ml Blut in die Spritze aufgenommen wurde.

2.2.8 Aufbereitung von Vollblut

100 µl des Vollbluts wurden verwendet, um ein Blutbild im Bloodcounter (XN-1000, Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt) darstellen zu lassen. Mit dem verbleibenden Blut wurde wie folgt vorgegangen:

Im Unterschied zu Blutplasma enthält Blutserum kein Fibrinogen. Nach Blutentnahme wurde die Probe für ca. eine halbe Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis diese schließlich für 5 Minuten mit 10.000 G bei 20°C zentrifugiert wurde. Der flüssige Teil des geronnenen Blutes wurde abpipettiert und zur langfristigen Lagerung bei -80°C eingelagert. Zur Gewinnung von Blutplasma wurde die Probe für 10 Minuten mit 2.000 G bei einer Temperatur von 4°C zentrifugiert, der Überstand aliquotiert und ebenfalls bei -80°C eingelagert.

2.2.9 Entnahme der Vena cava inferior

Direkt nach intrakardialer Blutentnahme wurde die Maus durch zervikale Dislokation getötet. Das Ableben der Maus wurde haptisch durch die durchtrennte Halswirbelsäule bestätigt. Wie auch am Tag zuvor wurde nochmals das Abdomen eröffnet und die Eingeweide ausgelagert. Im Falle eines positiven Ausgangs des Experiments war nun ein venöser Thrombus in der Vena cava inferior zu erkennen. Das rote Blutgerinnsel enthielt neben Erythrozyten und Leukozyten gelegentlich auch weißliche thrombozytäre Bestandteile, welche auch makroskopisch zu erkennen waren. Die Entnahme der Hohlvene wurde kranial durch Einschnitt unterhalb der beiden Nierenvenen und kaudal oberhalb der Venae iliacae communes vorgenommen. Anschließend wurde das Gewicht des Thrombus in Milligramm notiert, das Material zur Langzeitlagerung in eine Kryoeinbettform (Tissue-Tek Cryomold Intermediate, Sakura Finetek

Japan Co. Ltd., Tokyo, Japan) überführt und in Tissue-Tek (Sakura Finetek Japan Co. Ltd., Tokyo, Japan) eingebettet. Um das Nettogewicht des entnommenen Thrombus zu ermitteln, wurde das durchschnittliche Gewicht der unteren Hohlvene vom Bruttogewicht des jeweiligen Thrombus abgezogen. Das Durchschnittsgewicht der Vena cava inferior ergab sich aus einigen Experimenten, in denen kein Thrombus aufzufinden war. Nach kurzzeitiger Lagerung auf Trockeneis wurden die eingefrorenen Thromben bei -80°C gelagert.

2.2.10 Organ- und Knochenentnahme

Um weitere histologische Untersuchungen durchzuführen, wurden ebenfalls Milz, Niere, Femur sowie der untere Teil der Wirbelsäule entnommen. Anliegendes Gewebe der Organe wurde entfernt und das Material nach Extraktion zunächst in PBS (DPBS 1x, Gibco, Waltham, USA) gelagert, um eine Austrocknung zu verhindern. Um das Femur zu entnehmen, wurden mittels Skalpell zwei Einschnitte entlang des Knie- und Hüftgelenks vorgenommen. Hierbei wurde insbesondere darauf geachtet, die Knochenstruktur nicht zu beschädigen und nur Knochen mit intaktem Knochenmark zu entnehmen. Die anschließende Entnahme der Wirbelsäule erfolgte über einen tiefen transversalen Einschnitt. Dabei wurde der Bereich der Lenden- und Teile der Brustwirbelsäule entnommen. Die Gesamtlänge betrug in etwa 2-3 cm. Die Knochen wurden daraufhin mithilfe eines Skalpells von umliegendem Gewebe befreit und in PBS gelagert. Nach Entnahme der Organe und Knochen wurde das Material zur Fixierung über Nacht in 4 % Paraformaldehydlösung (Formaldehydlösung 4 %, MicroCos GmbH, Garching) eingelegt und bei 4°C aufbewahrt. Am Folgetag wurde das Material mit PBS gewaschen und die Organe in 70 % Ethanol überführt. Die Knochen wiederum wurden zunächst einer Decalcifizierung unterzogen. Dabei wurde das Material für zwei weitere Tage bei 4°C in 20 ml 0,5 M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA solution pH 8.0 (0.5 M), AppliChem GmbH, Darmstadt) eingelegt. Nach einem weiteren Waschvorgang mit PBS wurde die Gewebsbehandlung des Knochen- sowie Organmaterials über Nacht in einem Gewebsprozessor (Shandon Citadel 1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) vervollständigt. Mittels automatisiertem Einbettungsprogramm erfolgte die Gewebsbehandlung innerhalb von 14 Stunden durch Eintauchen in verschiedene Einbettungslösungen. Die ersten beiden Bäder enthielten 70 % Ethanol, daraufhin wurden die Proben jeweils drei Mal in Bäder mit 96 % Ethanol überführt. Es folgten drei weitere Bäder,

gefüllt mit reinem Ethanol. Die Behandlung wurde durch zwei Xylol-Bäder fortgesetzt und in zwei anschließenden Bädern mit flüssigem Paraffin beendet.

Am darauffolgenden Tag wurden alle Materialien an einer Ausgießstation (Tissue-Tek TEC 5 Paraffinausgießkonsole, Sakura Finetek Japan Co. Ltd., Tokyo, Japan) in Paraffin eingebettet. Das nun in metallischen Ausgießformen eingebettete Material wurde auf eine Kühlplatte gestellt, um eine zügige Aushärtung des Paraffins zu fördern. Nach Entnahme aus den Formen wurde das Material zur Langzeitlagerung numerisch angeordnet und trocken bei Raumtemperatur gelagert.

3. Mikroskopie

3.1 Prinzip der Fluoreszenz

Die Fluoreszenz als eine Form der Lumineszenz beschreibt einen physikalischen Vorgang, bei dem ein Molekül durch Absorption von elektromagnetischer Strahlung in einen energetisch höheren Zustand überführt und durch Emission von Photonen wieder in den Ausgangszustand versetzt wird. Das Jabłoński-Diagramm charakterisiert hierbei die Energiezustände sowie die energetischen Änderungen der Elektronenübergänge. Die Rückkehr in den Ausgangszustand kann durch verschiedene physikalische Vorgänge geschehen. Im Falle der Fluoreszenz wird ein Elektron im tiefsten angeregten Zustand S_1 in den Grundzustand S_0 befördert, wodurch ein Photon emittiert werden kann. Das Emissionsmaximum des Moleküls findet sich im Vergleich zum Absorptionsmaximum im langwelligeren Bereich, da Energie in Form von Molekülschwingungen abgegeben wird. Dieses Phänomen wird auch als Stokes-Verschiebung bezeichnet [131, 132].

3.2 Epifluoreszenzmikroskopie

Grundsätzlich besteht ein Epifluoreszenzmikroskop aus folgenden Bauteilen: einer Lichtquelle, einem optischen Filter, einem Strahlteiler, einem Objektiv und dem Detektor [133]. Im Falle des verwendeten Mikroskops Zeiss Axio Imager 2 Epifluorescence wurde eine Quecksilberdampfampe (Osram HXP R120W/45 C VIS, Osram Licht AG, München) als

Lichtquelle benutzt. Durch den optischen Filter wird die Wellenlänge des Lichts transmittiert, die dem Absorptionsmaximum des jeweiligen Moleküls entspricht.

3.3 Konfokalmikroskopie

Im Unterschied zu gewöhnlichen Lichtmikroskopen ist das Konfokalmikroskop mit einer sogenannten Lochblende ausgestattet, die es ermöglicht, den Lichtstrahl fokussierter Bereiche hindurchzulassen, wohingegen das Licht außerhalb der Schärfenebene die Blende nicht passiert. Nur der fokussierte Bereich des zu vermessenden Objekts wird vom Detektor erfasst. Somit wird anhand der Lichtintensität des fluoreszierenden Objekts festgestellt, ob es mit der Lochblende zur gleichen Zeit den gleichen Brennpunkt aufweist [134, 135].

4. Immunhistologie

4.1 Kryoschnitte

Um die murinen Thromben immunhistologisch aufarbeiten zu können, wurden sie kurzzeitig aus der Lagerung bei -80°C entnommen und zur Anfertigung von Serienschnitten am Kryotom vorbereitet. Der Kryostat (CryoStar NX70, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ermöglichte eine präzise Temperaturregelung der Kammer sowie der Klingenvorrichtung. Somit wurde gewährleistet, dass die Präparate bei konstanter Temperatur verarbeitet wurden, was auch die Reproduzierbarkeit der Schnitte erhöhte. Die Kryoschnitte wurden stets bei -20°C durchgeführt. Dies trug einerseits zum langfristigen Erhalt des Materials bei und andererseits erleichterte eine ausreichende Festigkeit den Schneidevorgang. Grundsätzlich wurden immer mehrere Transversalschnitte mit einer Dicke von $5\ \mu\text{m}$ angefertigt, ausgehend von der Thrombusmitte. Nach Anfertigung der Schnitte wurden die Präparate auf Objektträger übertragen (Superfrost Plus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und mittels Lichtmikroskop auf ihre Qualität überprüft. Runde, ausgefüllte Thromben mit vollständig erhaltenem Endothel wurden stets bevorzugt. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Präparate bei -20°C gelagert.

4.2 Paraffinschnitte

Die bei Raumtemperatur gelagerten Paraffinblöcke wurden zur weiteren Verarbeitung in die Halterung des Rotationsmikrotoms (Thermo Scientific Rotary Microtome Microm HM 340 E, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) eingespannt. Je nach Beschaffenheit und Porosität des Präparats wurden Serienschnitte zwischen 5 und 8 μm angefertigt. Erfahrungsgemäß waren dünnere, einschichtige Präparate im späteren Verlauf leichter zu verarbeiten und verbesserten die Bildqualität. Die Paraffinschnitte wurden vorsichtig in ein ca. 40°C warmes Wasserbad gelegt, um eine Glättung der Paraffinoberfläche zu ermöglichen. Mithilfe einer Pinzette wurden die Präparate aus dem Wasserbad entnommen und auf Objektträger übertragen. Nach Trocknung über Nacht bei 37°C im Trockenschrank wurden die Präparate bei Raumtemperatur gelagert.

4.3 Färbung muriner Thromben

Für die immunhistologischen Färbungen der venösen Thromben wurde nach einem standardisierten Protokoll vorgegangen: Nach dreiminütiger Fixierung mit 4 % Paraformaldehydlösung (Formaldehydlösung 4 %, MicroCos GmbH, Garching) wurde das Präparat 30 Minuten mit Ziegen-Serum (Normal goat serum blocking solution, Invitrogen, Waltham, USA) versetzt, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Im Anschluss darauf wurde der in PBS verdünnte Primärantikörper in der erforderlichen Konzentration zugegeben. Die Zugabe des Primärantikörpers erfolgte 60 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Daraufhin wurde der Sekundärantikörper für 60 Minuten zugesetzt. Die Färbungen wurden durch Zugabe des DNA-anfärbenden Hoechst (Hoechst 33342 Trihydrochlorid Trihydrat, Invitrogen, Eugene, USA) vervollständigt. Der Farbstoff wurde für 3 Minuten in einer Konzentration von 1:1000 zugegeben. Zwischen den einzelnen Schritten wurde mehrmals mit PBS und Tween 0,1 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) gewaschen. Nach dem Auftragen von Fluorescent Mounting Medium (Agilent Dako, Santa Clara, USA) und dem Überdecken mit einem Deckgläschen wurden die Objektträger bei 4°C gelagert. Isotypkontrollen wurden gleichermaßen durchgeführt.

Tabellarische Auflistung der verwendeten Antikörper

Art der Färbung	Art des Antikörpers	Name des Antikörpers	Konjugat	Hersteller	Referenznummer	Klon	Verwendete Konzentration
Thrombozyten	Primärantikörper	Rat anti-Mouse CD41a	PE	eBioscience	12-0411-83	eBioMWRReg30 (MWRReg30)	2 µg/ml
	Isotypkontrolle	Rat IgG1 kappa	PE	eBioscience	12-4301-82	eBRG1	2 µg/ml
	Sekundärantikörper	Goat anti-Rat IgG (H+L)	Alexa Fluor 594	Invitrogen	A-11007	polyklonal	10 µg/ml
Neutrophile Granulozyten	Primärantikörper	Rat anti-Mouse Ly-6G	PE	BioLegend	127608	1A8	0,67 µg/ml
		Rabbit anti-Human MPO		Dako	A0398	polyklonal	11 µg/ml
	Isotypkontrolle	Rat IgG2a κ	PE	BioLegend	400508	RTK2758	0,67 µg/ml
		Rabbit Ig fraction		Dako	X0936	polyklonal	11 µg/ml
	Sekundärantikörper	Goat anti-Rat IgG (H+L)	Alexa Fluor 594	Invitrogen	A-11007	polyklonal	10 µg/ml
		Goat anti-Rabbit IgG (H+L)	Alexa Fluor 488	Invitrogen	A-11034	polyklonal	10 µg/ml
Monozyten	Primärantikörper	Rat anti-Mouse F4/80		Bio-Rad	MCA497GA	Cl:A3-1	10 µg/ml
	Isotypkontrolle	Rat IgG2b kappa		eBioscience	14-4031-85	eB149/10H5	10 µg/ml
	Sekundärantikörper	Goat anti-Rat IgG (H+L)	Alexa Fluor 594	Invitrogen	A-11007	polyklonal	10 µg/ml

4.4 Färbung muriner Paraffinschnitte

Um weitere Rückschlüsse hinsichtlich der Gewebsbeschaffenheit von entnommenen Organen und Knochen ziehen zu können, wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung vorgenommen. Hierbei dient der saure Farbstoff Hämatoxylin nach Oxidation der Färbung saurer Zellstrukturen. Hierzu werden vor allem die DNA des Zellkerns und die Ribosomen in blauer Farbe angefärbt. Im Gegensatz dazu erscheinen basische Zellstrukturen nach Färbung mit

Eosin rot. Insbesondere werden mit diesem Farbstoff Plasmaproteine und Mitochondrien erfasst.

Folgende Schritte wurden standardisiert für alle Gewebsschnitte durchgeführt: Alle Objektträger wurden vor Beginn der Färbung zunächst in eine Glasküvette überführt und für 15 Minuten im Trockenschrank verwahrt. Die Temperatur betrug 37°C. Anschließend sind die Objektträger in verschiedene mit organischen Lösungsmitteln gefüllte Bäder getaucht worden. Zur Entparaffinierung sind die Gewebsschnitte zunächst für 5 Minuten in ein frisch vorbereitetes Bad mit Xylol überführt worden. Dieser Vorgang wurde im nächsten Bad wiederholt. In den nächsten zwei Bädern mit reinem Ethanol verblieben die Schnitte für je 2 Minuten. Im Anschluss darauf wurden die Objektträger in ein Bad mit 96 % Ethanol und schließlich 70 % Ethanol eingetaucht. Daraufhin folgte ein Spülvorgang mit demineralisiertem Wasser. Die Hämatoxylin-Färbung wurde mit einem Bad aus Mayer's Hämalaunlösung (Hämalaunlösung sauer nach Mayer, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) begonnen, worin die Schnitte für 5 Minuten verblieben. Nach kurzer Behandlung mit 0,1 % HCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) wurden die Präparate für 10 Minuten mit fließendem Leitungswasser versetzt. Daraufhin erfolgte die Zugabe in ein Bad, welches 1 % Eosin-Lösung (Eosin G – Lösung 1 % wässrig, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) enthielt. Nach weiteren 5 Minuten wurden die Schnitte nochmals mit Leitungswasser gespült und darauf die Lösungsmittelbäder in umgekehrter Reihenfolge durchlaufen. Als Eindeckmedium wurde ein auf Xylol basierendes Einbettmedium verwendet (Pertex, Medite Medical GmbH, Burgdorf) und darauf ein Deckgläschen aufgesetzt. Über Nacht wurden die eingebetteten Präparate unter dem Abzug luftgetrocknet und konnten schließlich bei Raumtemperatur gelagert werden.

5. Zellkultur

5.1 Auftauen und Ansetzen der Zellkultur

Alle Zellkulturexperimente wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die beiden Zelllinien MOPC315.BM und MOPC315.36 wurden in Flüssigstickstofftanks bei einer Temperatur von -196°C verwahrt.

Die in 1 ml-Ampullen enthaltenen Zellen wurden aus den Flüssigstickstofftanks entnommen und vor Verwendung auf Trockeneis gelegt. Dies verhinderte ein vorzeitiges Auftauen und damit ein unerwünschtes Absterben der Zellen. Um eine neue Zellkultur anzusetzen, wurde zunächst neues Suspensionsmedium unter der Sterilwerkbank hergestellt:

- 500 ml RPMI Medium 1640 GlutaMax-I (Gibco, Waltham, USA)
- 10 % FBS Superior stabil (Bio&SELL GmbH, Feucht/Nürnberg)
- 1 % MEM Non-essential Amino Acid Solution (100x) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- 0,005 % 1-Thioglycerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- 0,03 % Gentamicin (50 mg/mL) (Gibco, Waltham, USA)

Um die Ampullen aufzutauen, wurden sie in ein auf 37°C warmes Wasserbad gehalten. Während des Auftauvorgangs wurden die Ampullen vorsichtig im Wasserbad geschwenkt und zwischenzeitlich mehrmals überprüft, ob es bereits zu einer Verflüssigung gekommen ist. Nach leichter Verflüssigung des Inhalts wurde die Ampullenoberfläche vorsichtig mit Antifect N liquid (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt) desinfiziert. In der Sterilwerkbank wurde eine Zellkulturflasche (Nunc EasYFlask 75 cm², Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) sowie auf 37°C erwärmtes Zellkulturmedium bereitgestellt. Ausgestattet mit Laminar Air Flow, war es in der Werkbank möglich, die Sterilität aller Reagenzien zu wahren. Nun wurde der gesamte Inhalt der Ampullen mittels Pipette entnommen und vorsichtig mit einer kleinen Menge an Medium gemischt. Nach Zentrifugation für 5 Minuten mit 170 G (Beschleunigung vier, Bremse vier) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit frischem Suspensionsmedium resuspendiert. Das zytotoxische DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) wurde somit durch den letzten Zentrifugationsschritt entfernt. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine Zellkulturflasche überführt und bei 37°C inkubiert.

5.2 Medienwechsel und Splitting

Die in den Zellkulturflaschen enthaltenen Myelomzellen wurden täglich mithilfe eines Lichtmikroskops überprüft (Axiovert 100, Carl Zeiss AG, Oberkochen). Hierbei wurde insbesondere auf eine rundliche, gleichmäßige Zellform geachtet. Erfahrungsgemäß waren bis zu zehn Tage nach Ansetzen einer neuen Zellkultur notwendig, um teilungsfähige, vitale Zellen

zu erhalten. Ebenso wurde regelmäßig frisches Medium zugesetzt, um eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen sowie die Teilungsfähigkeit der Zellen zu gewährleisten. Um neues Medium zuzusetzen, wurde der gewünschte Anteil an resuspendierter Zellsuspension durch erwärmtes Medium ersetzt. Im stark verdünnten Zustand wies die Zellkultur durch den Farbindikator Phenolrot eine rötliche Färbung auf, was einem physiologisch-neutralen pH-Wert entsprach. Im weiteren Verlauf der Inkubation im Wärmeschrank veränderte sich die Färbung allmählich hin zu einer leicht gelblichen Färbung, was eine Erniedrigung des pH-Werts bedeutete. Um vitale Zellkulturen für bevorstehende Experimente möglichst erhalten zu können, wurden die Suspensionszellen auf mehrere Zellkulturflaschen verteilt. Hierbei wurden einige ml an Zellsuspension entnommen und die Flasche mit Medium auf die erforderliche Menge aufgefüllt.

5.3 Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die neue Zählkammer nach Neubauer (Neubauer improved Zählkammer, LO-Laboroptik Ltd, Lancing, UK) verwendet. Bei dieser Zellkammer handelt es sich um eine Glasplatte mit Vertiefungen, die als Zählgitter angeordnet sind. Die Kammer besteht aus neun Großquadraten mit einer Fläche von jeweils 1 mm^2 , angeordnet in Eck- und Mittelquadrate. Das zentrale Großquadrat ist in 25 kleinere Gruppenquadrate eingeteilt und eignet sich somit eher, kleinere Zellen auszuzählen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die vier Eckquadrate gewählt, welche aus insgesamt 64 Einzelfeldern bestehen. Hierfür wurde zunächst eine kleine Menge an Zellsuspension mit der gleichen Menge an Trypanblau vermischt und mehrmals langsam resuspendiert. Der anionische Bisazofarbstoff eignet sich, um tote Zellen dunkelblau anzufärben und um somit die Zellvitalität zu überprüfen. Um die Zellzahl zu berechnen, wurde der Mittelwert der vier Quadrate mit dem Faktor 10.000 sowie mit dem Verdünnungsfaktor zwei multipliziert. Demnach erhielt man die Zellzahl pro ml an Zellsuspension [136, 137].

5.4 Einfrieren

Um vitale, teilungsfähige Zellen langfristig erhalten zu können, wurden sie mit einem Einfriermedium versetzt. Dieses bestand aus 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) und 40 % FBS in MOPC-Medium.

Nach Resuspendieren in Einfriermedium wurde die Suspension auf die nötige Anzahl an Ampullen verteilt und auf Trockeneis gelagert. Zur weiteren Lagerung wurden die Ampullen in Flüssigstickstoff gelagert.

6. In-vitro Experimente

6.1 ELISA

6.1.1 Grundlegendes

Ein sogenannter enzyme-linked immunosorbent assay ist eine immunologische Technik, mit deren Hilfe spezifisch Antigene aus einer Probe festgestellt werden können.

Je nach Testverfahren kann die Antigenbestimmung direkt oder indirekt erfolgen: Direkt meint in diesem Sinne, dass das an die Oberfläche der Mikrotiterplatte gebundene Antigen unmittelbar über einen Antikörper erfasst werden kann. Der Antikörper ist hierbei normalerweise an ein Enzym gekoppelt, welches bei Zugabe des Substrats dieses in ein farbles Produkt umsetzt. Im Unterschied dazu wird bei einem indirekten ELISA das Zielantigen zunächst über einen Primärantikörper markiert, um anschließend über einen enzymgekoppelten Sekundärantikörper spezifisch erfasst zu werden.

Bei der hier vorgestellten Methode handelt es sich um einen sogenannten Sandwich-ELISA, bei der der Primärantikörper zunächst an die Oberfläche der Mikrotiterplatte bindet und das Zielantigen anschließend zugegeben und vom Primärantikörper erfasst wird. Der darauf zugeführte Sekundärantikörper bindet nun an ein anderes Epitop des Zielantigens und ist zudem enzymgekoppelt, was wiederum einen Farbumschlag und damit eine Signaldetektion ermöglicht. Ein Sandwich-ELISA zeichnet sich durch eine besonders hohe Sensitivität und Spezifität aus, da zwei Antikörper zur Detektion des Zielantigens hierzu beitragen [138].

Das Reaktionsprinzip beruht auf der in der Biotechnologie und Immunologie bekannten Wechselwirkung zwischen Streptavidin und Biotin: Bei Streptavidin handelt es sich um ein tetrameres Protein aus *Streptomyces avidinii*, welches eine besonders hohe Affinität zu Biotin aufweist. Auch als Vitamin H oder Vitamin B7 bekannt, erfüllt Biotin eine Reihe von Aufgaben in Stoffwechselprozessen und Funktionen im Nukleus. Im Unterschied zu Avidin ist Streptavidin kein Glykoprotein, wodurch unspezifische Bindungen in Streptavidin-Biotin-Systemen eher ausgeschlossen werden können. Das aus vier einheitlichen Untereinheiten aufgebaute Streptavidin kann bis zu vier Biotin-Moleküle binden und ist wiederum kovalent an das Enzym Alkalische Phosphatase gebunden [139]. In der Reaktion spaltet das Enzym eine Phosphatgruppe des darauf zugesetzten Substrats ab, was dieses in das gelb gefärbte Produkt 4-Nitrophenol umsetzt

6.1.2 Versuchsvorbereitung

Dieser Versuchsaufbau stellte eine Detektionsmethode dar, um qualitativ und quantitativ IgA aus Seren und Plasmen der injizierten Mäuse zu bestimmen.

Für den Versuch wurde eine 96-Well-Titerplatte verwendet (Corning Inc., New York, USA).

Zunächst wurden am Tag vor Versuchsbeginn alle Lösungen unter der Sterilwerkbank hergestellt.

Folgende Lösungen wurden für jeden Versuch frisch hergestellt:

1) **PBS + Natriumazid** (10 ml)

0,02 % Natriumazid 0,1 M (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

2) **Blocklösung** (20 ml)

0,02 % Natriumazid 0,1 M

0,1 % BSA 5 %

16 ml PBS

3) **ELISA-Puffer** (40 ml)

0,02 % Natriumazid 0,1 M

0,1 % BSA 5 %

0,1 % Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

39,2 ml PBS

4) **Substrat-Puffer** (20 ml)

1,94 ml Diethanolamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

16 ml destilliertes Wasser

2,02 mg $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (EMD Millipore Corp., Billerica, USA)

62 μ l Natriumazid 0,1 M

0,2 ml 37 % HCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

ad 20 ml destilliertes Wasser

Für die Waschvorgänge wurde einmalig ein Wasch-Puffer hergestellt, der für jeden Versuchstag 1:25 mit destilliertem Wasser verdünnt wurde.

1) **25x Wasch-Puffer** (250 ml)

0,974 g NaH_2PO_4 (Natriumphosphat monobasisch, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

4,791 g Na_2HPO_4 (Natriumphosphat dibasisch Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

51,125 g NaCl (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)

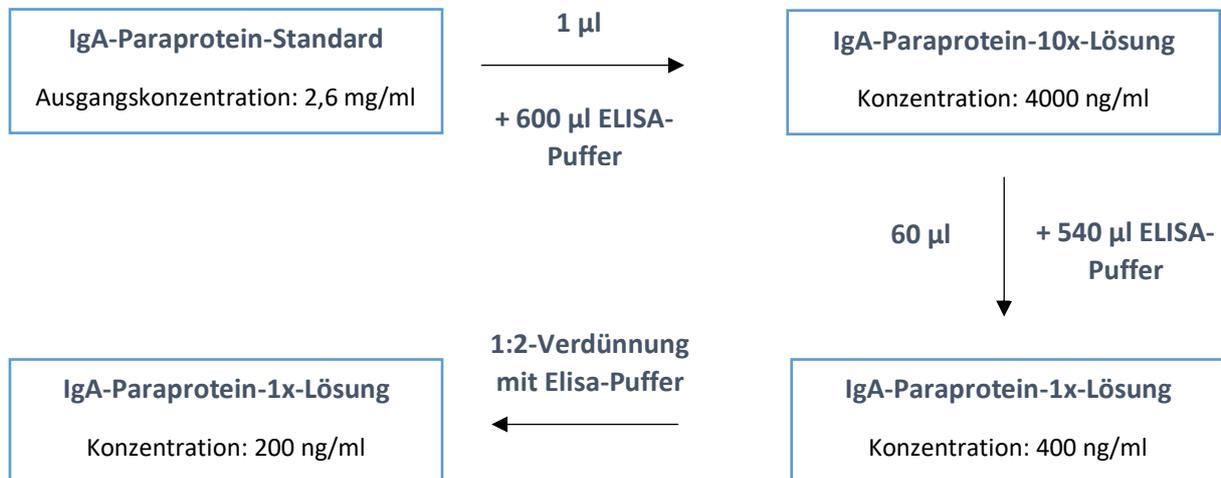
6,25 ml Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

ad 250 ml destilliertes Wasser

6.1.3 Versuchsdurchführung

Die Mikrotiterplatte wurde am Abend vor Versuchsbeginn mit dem Antikörper Ab2.1-4 gecoatet. Dabei wurde der Antikörper mit einer Lösung aus PBS mit 0,02 % Natriumazid verdünnt und 100 μ l der verdünnten Lösung pro Well zugegeben, um schließlich eine Endkonzentration von 2 μ l/ml Ab2.1-4 zu erhalten. Die mit der Coating-Lösung versetzte Mikrotiterplatte wurde mit einem Deckel abgedeckt und an den Seitenrändern mit Parafilm verschlossen. Anschließend wurde die ELISA-Platte auf einen Kompaktschüttler gestellt und

bei 4°C über Nacht inkubiert. Am Morgen des Versuchstags wurde die Lösung von der Mikrotiterplatte abpipettiert und im Anschluss mit einer Blocklösung versetzt. Hierbei wurden 200 µl dieser Lösung pro Well zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit sind die Probelösungen der Plasmen und Seren der Versuchstiere vorbereitet worden. Hierbei wurde zunächst eine Verdünnungsreihe des IgA-Paraprotein-Standards hergestellt:



Der letzte Verdünnungsschritt wurde so oft wiederholt, bis die Paraprotein-Konzentration nicht mehr messbar war. Dies war erfahrungsgemäß nach ca. 8-10 Verdünnungsschritten bei einer 1:2-Verdünnung der Fall. Zunächst wurde die Blocklösung abpipettiert und der vorbereitete IgA-Paraprotein-Standard auf die Well-Platte gegeben: Angefangen bei einer Konzentration von 400 ng/ml, wurde in das darunterliegende Well jeweils die Hälfte der vorherigen Konzentration an Paraprotein-Standard zugegeben. Neben dem Standard wurde ebenfalls ELISA-Puffer als Negativkontrolle zugegeben. Schließlich wurden die zu bestimmenden Proben 1:2 mit ELISA-Puffer verdünnt und jeweils 100 µl der Probelösungen auf die Mikrotiterplatte pipettiert. Sowohl für den IgA-Paraprotein-Standard, als auch für alle Probelösungen wurden jeweils 100 µl in zwei Wells gegeben, um nach der Messung den Durchschnittswert bestimmen zu können. Die Mikrotiterplatte wurde nach Zugabe aller Probelösungen nochmals abgedeckt, mit Parafilm verschlossen und auf den Kompaktschüttler gestellt. Die Inkubation wurde nun für 2 Stunden bei 37°C im Inkubator durchgeführt. Im Anschluss wurden alle zugegebenen Lösungen verworfen und die Mikrotiterplatte drei Mal vorsichtig mit dem frisch angesetzten Wasch-Puffer gespült. Anschließend erfolgte die Zugabe des Antikörpers Biotin Rat Anti-Mouse IgA (BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA). Dieser

wurde zunächst mit ELISA-Puffer so verdünnt, dass die Endkonzentration 1 µg/ml betrug und jeweils 100 µl pro Well zugeführt. Nach anschließender Inkubation bei 37°C für eine Stunde wurde die überschüssige Lösung entfernt und nochmals drei Mal gespült. Nun wurde das Enzym Streptavidin Alkaline Phosphatase Conjugate (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) zugegeben. Dies wurde 1:1000 mit ELISA-Puffer verdünnt und es wurden nochmals 100 µl pro Well pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde nochmals für eine Stunde bei 37°C inkubiert, die Lösung entfernt und drei Mal gewaschen. Vor Zugabe von Phosphatase-Substrat (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), wurde 1 g des Pulvers in 20 ml destilliertem Wasser gelöst und Aliquots vorbereitet. Nach einer 1:50-Verdünnung mit Substrat-Puffer wurde nochmals 100 µl pro Well zugegeben. Im Anschluss wurde die ELISA-Platte nach 10-30 Minuten bei einer Absorption von 405 nm ausgelesen.

6.2 NETosis-Assay

6.2.1 Grundlegendes

Dieses in-vitro Experiment diente dem Zweck, die Effekte des Zellkulturüberstands beider verwendeter Myelom-Zelllinien auf neutrophile Granulozyten zu untersuchen.

Neutrophile sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems und sind neben der Phagozytose von Bakterien sowie der Exozytose antibakterieller Stoffe aus Granula zur NETose befähigt. Dies bezeichnet eine auf einen pathogenen Stimulus zurückzuführende Aktivierung von Neutrophilen, die zur Freisetzung bakterienbindender DNA führt [140].

Grundsätzlich werden zwei Arten der NETose unterschieden: die suizidale und die vitale NETose.

Bei der suizidalen NETose handelt es sich um einen NADPH-Oxidase-abhängigen Vorgang, der zur Dekondensation von Chromatin und schließlich zum Aufreißen der Kernhülle führt. Typischerweise kann dieser Prozess experimentell durch Zugabe von PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) in Gang gesetzt werden, weshalb es auch in diesem Versuchsaufbau als Positivkontrolle diente. Im Unterschied dazu wird die vitale NETose üblicherweise durch Einwirkung von bakteriellem Lipopolysaccharid hervorgerufen.

Bei dieser Art der NETose behält der neutrophile Granulozyt auch nach NET-Freisetzung seine ursprüngliche Immunfunktion bei. In diesem Fall wird über Exozytose DNA aus Vesikeln freigesetzt, wodurch die Plasmamembran unversehrt bleibt [141-143].

6.2.2 Versuchsvorbereitung

Folgende Lösungen wurden für jeden Versuchstag frisch unter der Sterilwerkbank vorbereitet:

- PBS + 2 % FBS (Bio&SELL GmbH, Feucht/Nürnberg)
- Erythrozyten-Lysepuffer (PBS + 10 % Lysepuffer) (BD Pharm Lyse Lysing Buffer; Becton Dickinson GmbH; Franklin Lakes, USA)
- PBS-EDTA-Stopp-Lösung (PBS + 2mM EDTA)
- NETs-Puffer (PBS + 2mM EDTA + 0,5 % FBS)
- NETs-Medium (VLE RPMI 1640 + 1 % L-Glutamin + 5% FBS + 2 % Ca²⁺ and 2 % Mg²⁺)
- PBS + 1,5 % PFA
- PBS + 0,1 % Triton X-100 (Triton X-100, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA)
- PBS + 1,5 % BSA

6.2.3 Neutrophilenisolierung

Am Versuchstag wurde eine BALB/c-Maus mit Isofluran sediert und durch zervikale Dislokation eliminiert. Um die Zellen aus dem Knochenmark zu isolieren, wurde jeweils zwei Mal Femur und Tibia entnommen und mittels Skalpells umliegendes Gewebe entfernt. Die Knochen wurden in eine mit PBS gefüllte Laborschale (CytoOne 100 x 20 mm Non-treated Culture Dish, sterile; Starlab International GmbH, Hamburg) überführt und jeweils die Enden mit einem Skalpell durchtrennt. Anschließend ist eine 10 ml-Spritze mit aufgesetzter 26 G-Kanüle in die Knochen geführt worden. Nun sind die Knochen mehrmals gründlich mit 4°C kaltem PBS und 2 % FBS durchgespült worden, um in der Laborschale das Knochenmark aufzufangen. Die vom Mark befreiten Knochen erschienen nun transparent und die Suspension in der Laborschale färbte sich leicht rötlich. Die Zellsuspension wurde nochmals in eine Spritze aufgenommen und in ein Laborröhrchen mit aufgesetztem 70 µm-Zellsieb (EASYstrainer 70 µm, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich) überführt. Nach

dreimaligem Spülen der Laborschale und anschließendem Sieben wurde die gesamte Zellsuspension nun bei 4°C mit 300 G für 6 Minuten zentrifugiert (Centrifuge 5810 R, Eppendorf SE, Hamburg). Danach wurde der Überstand vorsichtig entfernt und das Pellet in Erythrozyten-Lysepuffer (1x) (BD Pharm Lyse Lysing Buffer; Becton Dickinson GmbH; Franklin Lakes, USA) resuspendiert. Nach 5 Minuten wurde PBS-EDTA-Stopp-Lösung zugegeben, um eine weitere Erythrozytenlyse zu unterbinden. Nach anschließendem Zentrifugieren (300 G, 6 Minuten, 4°C, Bremse 9) und Verwerfen des Überstands wurde das Pellet in 100 µl NETs-Puffer resuspendiert. Die Isolierung erfolgte mithilfe eines Kits (Neutrophil Isolation Kit, mouse, Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach): Nach Zugabe von 25 µl Neutrophil Biotin-Antibody Cocktail (Lösung A Neutrophilen-Kit) wurde für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurden 10 ml an NETs-Puffer zugegeben, nochmals zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu dem resuspendierten Pellet wurden 50 µl an Anti-Biotin MicroBeads (Lösung B Neutrophilen-Kit) zugegeben und die Suspension 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml NETs-Puffer und einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde nochmals der Überstand entfernt. Resuspendiert wurde nun in 500 µl NETs-Puffer und die Suspension wurde bei 4°C kühl gehalten. In der Zwischenzeit wurden LD-Säulen (LS Columns, Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach) zur magnetischen Zellseparation vorbereitet. Die Säulen wurden mit NETs-Puffer durchgespült und mit der Zellsuspension versetzt. Nach mehrmaligen Spülvorgängen wurden die nun isolierten Neutrophile mit Medium versetzt und mithilfe von Trypanblau die Zellzahl bestimmt. Üblicherweise betrug diese zwischen 10.000.000 und 20.000.000 Zellen pro ml.

6.2.4 Versuchsdurchführung

Für dieses Versuchsvorhaben wurden die Deckgläschen zunächst mit 70 % Ethanol gewaschen. Daraufhin erfolgte ein dreimaliger Waschvorgang mit PBS. Die Deckgläschen wurden in eine 24-Wellplatte (Zellkulturtestplatte 24, TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) vorgelegt und Poly-L-Lysin (1:100) pro Well zugegeben. Für ca. 40 Minuten wurde die Wellplatte bei 37°C inkubiert und im Anschluss darauf mit PBS gespült. Je nach Versuchsaufbau wurden nun 250.000 – 500.000 Neutrophile pro Well zugegeben und die Platte samt Zellen für 1 Minute bei 500 rpm zentrifugiert. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei 37°C wurden NETosis-Aktivatoren sowie die zu untersuchenden

Zellkulturüberstände zugegeben: Als Positivkontrolle diente PMA in einer Konzentration von 500 nM und 1000 nM. Ebenso wurde 5 µM Ionomycin zur Überprüfung der NETose verwendet. Die Zellkulturüberstände der Zelllinie MOPC315.BM und MOPC315.36 wurden zugesetzt, um einen potentiellen Unterschied bezüglich der Neutrophilenaktivierung zu untersuchen. Nach einer Inkubationszeit von drei bis fünf Stunden bei 37°C wurde der Überstand in den Wells vorsichtig abpipettiert, gewaschen und mit 1,5 % Paraformaldehydlösung für 15 Minuten fixiert. In den folgenden Schritten wurde nach jeder Zugabe des jeweiligen Agens mit PBS gespült. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde für 5 Minuten 0,1 % Tritonlösung (Triton X-100, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) zugegeben. Unspezifische Bindungsstellen wurden für 30 Minuten mittels 1,5 % BSA geblockt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers (Polyclonal rabbit anti-human MPO, Agilent Dako, Santa Clara, USA) in einer Konzentration von 1:300 in PBS bei 4°C. Am Folgetag wurde für eine Stunde der Sekundärantikörper (AF 594 Goat ant-rabbit IgG, Invitrogen, Waltham, USA) in einer Konzentration von 1:100 in 1,5 % BSA zugesetzt. Die isolierten neutrophilen Granulozyten wurden anschließend mit SytoxGreen (SYTOX Green Nucleic Acid Stain, Invitrogen, Waltham, USA) in einer Konzentration von 1:5000 für eine Stunde versetzt. Nach 5-minütigem Zusatz von Hoechst (1:1000) wurden die Deckgläschen auf Objektträger übertragen, auf die ein Tropfen Fluorescent Mounting Medium gegeben wurde. Die am Zeiss Axio Imager 2 Epifluorescence aufgenommenen Bilder wurden anschließend über die Software ZEN 3.2 (blue edition) ausgewertet.

6.3 Aggregometrie

6.3.1 Grundlegendes

Nachfolgend soll eine Methode zur Bestimmung der Thrombozytenaggregation beschrieben werden. Das Prinzip der Aggregometrie nach Born besteht darin, dass nach Zugabe eines aggregationsfördernden Stoffs zu plättchenreichem Plasma (PRP) die Durchlässigkeit für einstrahlendes Licht erhöht wird. Vor der Messung ist somit die Transmission für Licht durch die ruhenden Plättchen erniedrigt. Neben der Lichtdurchlässigkeit spielte die Freisetzung von ATP aus aktivierten Thrombozyten eine wichtige Rolle. Das zugesetzte Luciferin-Luciferase-

Reagenz führte innerhalb einer Reaktion mit ATP zur Emission von Licht und konnte somit im Rahmen der photometrischen Messung bestimmt werden [144-147].

6.3.2 Versuchsvorbereitung

Zur Vorbereitung der Messungen wurden am Versuchstag bis zu vier Tiere in den OP-Bereich verbracht. Für die Entnahme von Vollblut wurden Spritzen mit Heparin (Heparin-Natrium-25000-ratiopharm, ratiopharm GmbH, Ulm) als Antikoagulans vorbereitet. Hierbei wurde zunächst Tyrode-Puffer auf den physiologischen pH-Wert von 7,4 eingestellt und 150 µl des Puffers mit 3 U Heparin vermischt. Das entnommene Blut wurde in ein Glasröhrchen überführt, welches 500 µl Tyrode-Puffer enthielt. Anschließend wurde vorsichtig resuspendiert. Das Blut wurde nun für 20 Minuten bei 65 G zentrifugiert (ohne Bremse, Beschleunigung auf fünf eingestellt). Daraufhin erfolgte eine Auswertung des Blutbilds mithilfe eines Zellcounters (XN-1000, Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt), um die Thrombozytenzahl pro µl zu bestimmen. Sie wurde auf 200.000 pro µl eingestellt. Bevor die erste Messung vorgenommen werden konnte, wurde das thrombozytenreiche Plasma 1:2 mit vorbereitetem MOPC-Medium verdünnt und auf 37°C erwärmt. Zur Bestimmung des Effekts der beiden MOPC-Überstände auf die Thrombozytenaggregation wurde das PRP ebenso 1:2 verdünnt. Hierbei sollte ein möglicher Einfluss des IgA-Paraproteins auf die Aggregationsgeschwindigkeit ermittelt werden [145].

6.3.3 Versuchsdurchführung

Das PRP erfuhr im Aggregometer eine konstante Durchmischung mittels Rührstäbchen. Zu der inkubierten Küvette wurde nun 25 µl an Chrono-Lume (Probe&Go Labordiagnostica GmbH, Lemgo) zugegeben und die Messung begonnen. Nach zweiminütiger Inkubation erfolgte die Zugabe des aggregationsfördernden PAR4-Agonisten. Hierbei handelt es sich um ein Peptid mit der Sequenz Ala-Tyr-Pro-Gly-Lys-Phe-NH₂ (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), welches im Stande ist, den Protease-aktivierenden-Rezeptor-4 zu aktivieren [145]. PAR4, der besonders auf Thrombozyten zu finden ist, wird durch Thrombin aktiviert und fördert deren Aggregation [148, 149]. Nach Zusatz des Agonisten in einer Konzentration von 200 µmol/l wurde die Messung für 6 weitere Minuten fortgesetzt. Als Vergleichsmessung diente plättchenarmes

Plasma (PPP), welches durch zwei Zentrifugationsschritte hergestellt wurde. Die erste Zentrifugation erfolgte bei 1200 G für 10 Minuten (volle Bremse, volle Beschleunigung). Der Überstand wurde anschließend nochmals bei 3000 G für 10 Minuten zentrifugiert und in eine Küvette pipettiert. Um die ATP-Messung standardisiert durchführen zu können, wurde ebenfalls für jedes Versuchstier ein ATP-Standard vorbereitet. Hierbei wurde ein nmol an ATP (Chrono-Lume, Probe&Go Labordiagnostica GmbH, Lemgo) zugegeben. Sowohl die durch die Messung erhaltene Area under the curve (AUC) als auch der maximale Kurvenausschlag dienten als Parameter zur Bestimmung der Aggregation [145].

IV. Ergebnisse

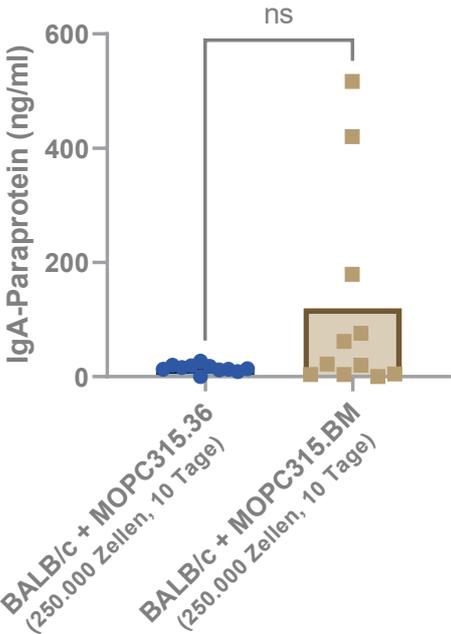
1. Die IgA-Paraprotein-Konzentration steigt mit der injizierten Zellzahl von MOPC315.BM und der Wartezeit an

Um eine erfolgreiche Injektion der Myelomzellen und deren Integration ins Knochenmark zu überprüfen, war es zunächst notwendig, die IgA-Paraprotein-Konzentration zu bestimmen. Zunächst wurden die Seren zur IgA-Paraprotein-Messung verwendet, jedoch zeigte sich sehr bald, dass Plasma deutlich besser zu verarbeiten war. So dienten die Plasmen der mit MOPC315.BM-injizierten Mäuse als Positivkontrolle, da diese Zelllinie in den betroffenen Mäusen zur Produktion von IgA-Paraprotein führt. Einer weiteren Gruppe an BALB/c-Mäusen wurde die Kontrollzelllinie MOPC315.36 injiziert, von der im Unterschied zur Positivgruppe keine IgA-Paraprotein-Sekretion ausgeht [125]. Überprüft wurde dies mithilfe der ausgewerteten ELISA-Messungen. In der Positivgruppe wurde anfänglich eine IgA-Paraprotein-Konzentration von mindestens 100 ng/ml angestrebt. Dieser Richtwert orientiert sich an der vorliegenden Literatur: Nach Injektion von 200.000 Zellen MOPC315.BM pro Maus und einer Wartezeit von 10 Tagen konnten die Autoren bereits signifikante Veränderungen der IgA-Paraprotein-Konzentrationen feststellen [111]. Um eventuelle Verluste während des Injektionsvorgangs auszugleichen, wurde bereits zu Beginn eine Zellzahl von 250.000 Zellen pro Maus injiziert.

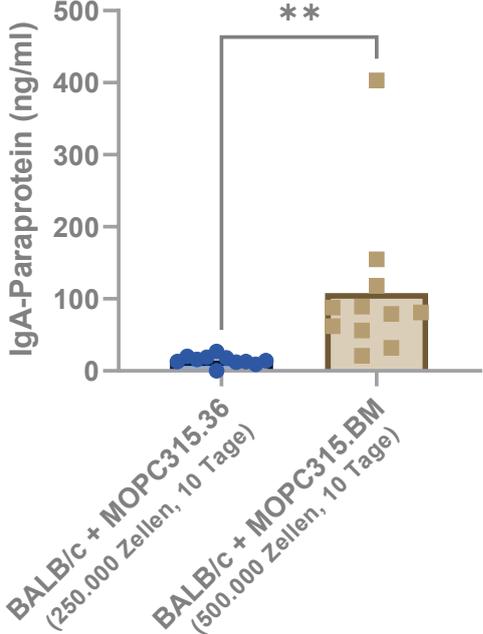
Wie erwartet bewegte sich die durchschnittliche IgA-Paraprotein-Konzentration der Kontrollgruppe (BALB/c + MOPC315.36) in allen Versuchsreihen auf einem konstant niedrigen Niveau. Leicht positive Abweichungen können mit hoher Wahrscheinlichkeit auf den Verdünnungsvorgang der Proben und auf die eingeschränkte Präzision der Messmethode zurückgeführt werden. Die durchschnittliche IgA-Paraprotein-Konzentration der Positivgruppe (BALB/c + MOPC315.BM) betrug bereits zu Beginn 119 ng/ml, jedoch konnte bei 36 % der Versuchstiere trotz MOPC315.BM-Injektion kein IgA-Paraprotein gemessen werden (Abbildung 4 A). Hier ist davon auszugehen, dass die injizierte Zellzahl oder die Wartezeit nicht ausreichte, um eine Integration der Myelomzellen im Knochenmark zu erreichen. Nach einer Verlängerung der Wartezeit auf 3 Wochen und einer injizierten Zellzahl von jeweils 500.000 Zellen pro Maus konnte ein signifikantes Ergebnis erreicht werden (p -Wert = 0,0004). Die

durchschnittliche IgA-Paraprotein-Konzentration der Positivgruppe betrug nun 386 ng/ml (Abbildung 4 C) und stieg im Vergleich zum ersten Versuchsprotokoll (Abbildung 4 A) um mehr als das Dreifache an. Nur bei 15 % der Positivgruppe war kein IgA-Paraprotein nachweisbar. Die Ergebnisse von Abbildung 4 B und D dienen der Vervollständigung dieser Versuchsreihe. Bemerkenswert ist hierbei, dass die durchschnittliche IgA-Paraprotein-Konzentration der Positivgruppe nach 6 Wochen und Injektion von 500.000 Zellen pro Maus nochmals auf 656 ng/ml anstieg.

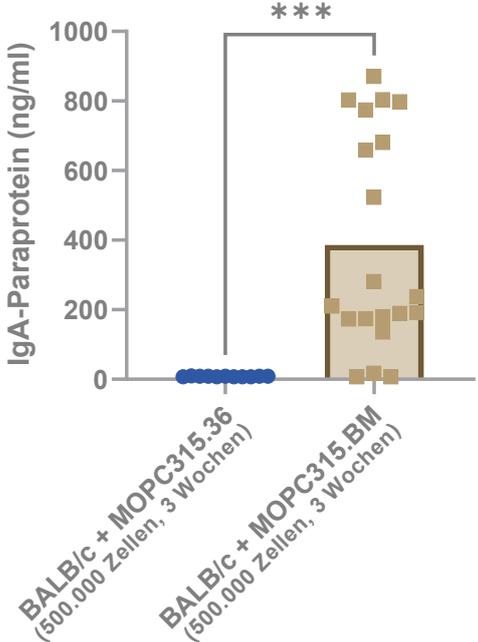
A



B



C



D

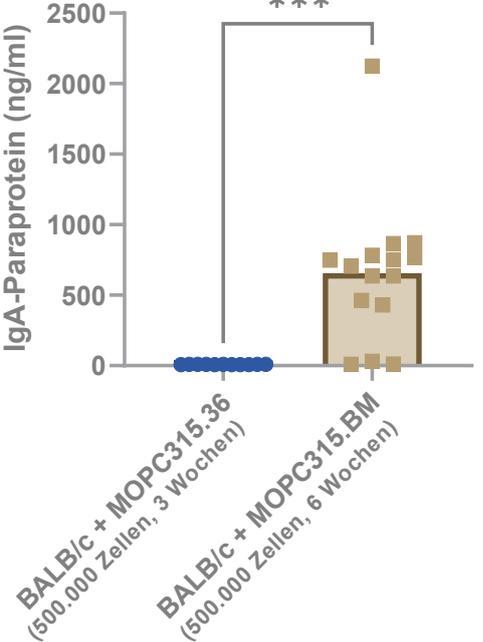


Abbildung 4: Gemessene IgA-Paraprotein-Konzentration in Abhängigkeit von der injizierten Zellmenge und der Wartezeit

Abbildung 4	
A)	BALB/c + MOPC315.36: Injektion von 250.000 Zellen, 10 Tage Wartezeit (n = 10) BALB/c + MOPC315.BM: Injektion von 250.000 Zellen, 10 Tage Wartezeit (n = 11)
B)	BALB/c + MOPC315.36: Injektion von 250.000 Zellen, 10 Tage Wartezeit (n = 10) BALB/c + MOPC315.BM: Injektion von 500.000 Zellen, 10 Tage Wartezeit (n = 11)
C)	BALB/c + MOPC315.36: Injektion von 500.000 Zellen, 3 Wochen Wartezeit (n = 11) BALB/c + MOPC315.BM: Injektion von 500.000 Zellen, 3 Wochen Wartezeit (n = 20)
D)	BALB/c + MOPC315.36: Injektion von 500.000 Zellen, 3 Wochen Wartezeit (n = 11) BALB/c + MOPC315.BM: Injektion von 500.000 Zellen, 6 Wochen Wartezeit (n = 15)

Bestimmung der p-Werte mittels T-Tests: ns = nicht signifikant; * = < 0,05; ** = < 0,01; *** = < 0,001

Aus diesen Daten lässt sich zusammenfassend schließen, dass die durchschnittliche IgA-Paraprotein-Konzentration mit der injizierten Zellzahl sowie einer Verlängerung der Wartezeit tendenziell ansteigt. Trotz Erhöhung beider Parameter kann dennoch beobachtet werden, dass ein kleiner Teil der mit MOPC315.BM-injizierten Versuchstiere kein IgA-Paraprotein produziert.

2. Die IgA-Paraprotein-Konzentration als Kennziffer zur Beurteilung der Tumorlast

2.1 Anämie und Gewichtsveränderung unter dem Einfluss von IgA-Paraprotein

Zur Überprüfung des Allgemeinzustands der Versuchstiere nach Injektion der Zelllinien MOPC315.BM und MOPC315.36 war eine engmaschige, tägliche Kontrolle notwendig. Neben der Überprüfung des Gewichts, sollten auch auffällige Veränderungen des Blutbilds erfasst werden, die eine erweiterte Charakterisierung des MOPC-Mausmodells ermöglichen. Insbesondere soll untersucht werden, ob das klassische Diagnosekriterium der Blutarmut auch im Mausmodell abgebildet werden kann.

Analog zu den Ergebnissen von Hofgaard et. al wird ein Zusammenhang zwischen steigender IgA-Paraprotein-Konzentration und einem Fortschreiten der Myelom-Erkrankung

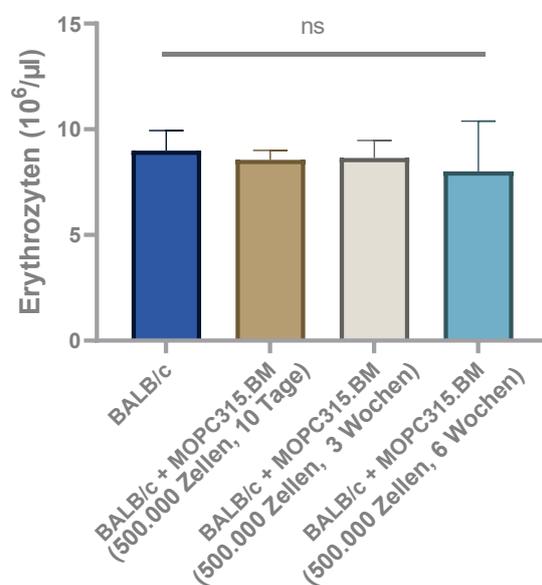
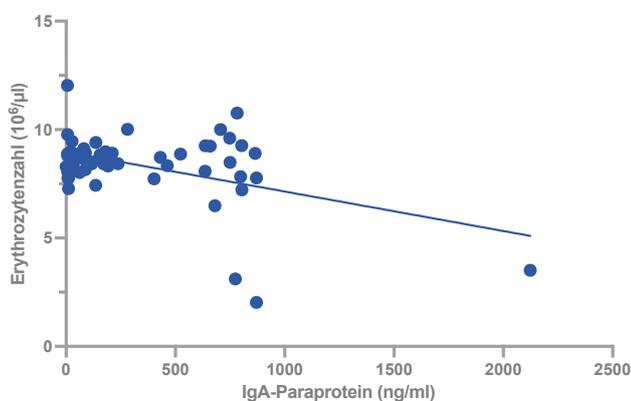
angenommen. Aus diesem Grund wurde die gemessene IgA-Paraprotein-Konzentration in Relation zu den Erkrankungsparametern Anämie und Gewichtsverlust gesetzt.

Eine mögliche Anämie der Versuchstiere kann anhand der gemessenen Erythrozytenzahl, des Hämoglobin- und des Hämatokrit-Wertes beurteilt werden. Um somit auf ein Fortschreiten der Erkrankung schließen zu können, wurde der Verlauf der IgA-Paraprotein-Konzentration den genannten Blutwerten gegenübergestellt.

Auffällig ist hierbei, dass Erythrozytenzahl, Hämoglobin- und Hämatokrit-Werte bei niedrigen IgA-Paraprotein-Konzentrationen nahezu unverändert blieben. Erst bei höheren Konzentrationen findet eine Abnahme dieser Parameter statt, was ebenfalls durch eine signifikante Korrelation bestätigt werden konnte: Mit steigender IgA-Paraprotein-Konzentration nehmen somit Erythrozytenzahl, Hämoglobin- und Hämatokrit-Werte tendenziell ab. Beim Vergleich der Absolutwerte wird deutlich, dass die größte Abnahme dieser Parameter nach 6 Wochen stattfindet. Ein signifikantes Ergebnis konnte in diesem Fall jedoch nicht festgestellt werden (Abbildung 5).

Eine Korrelation zwischen steigender IgA-Paraprotein-Konzentration und einer Gewichtsveränderung wurde nicht festgestellt. Zwar besteht eine geringfügige Tendenz der Gewichtsabnahme, jedoch resultierte hieraus kein signifikantes Ergebnis (Abbildung 6).

A



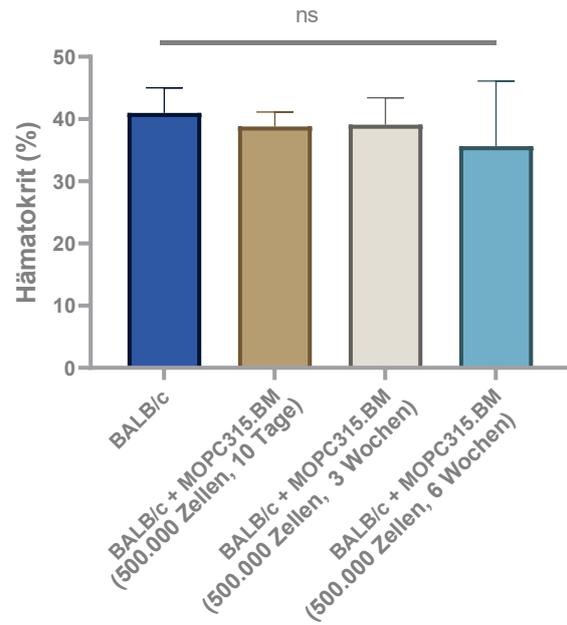
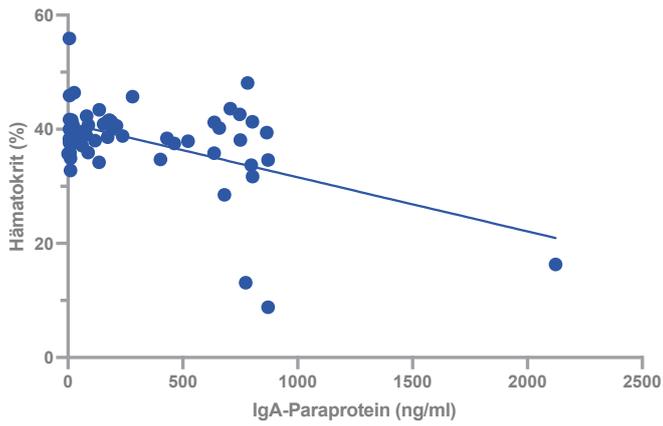
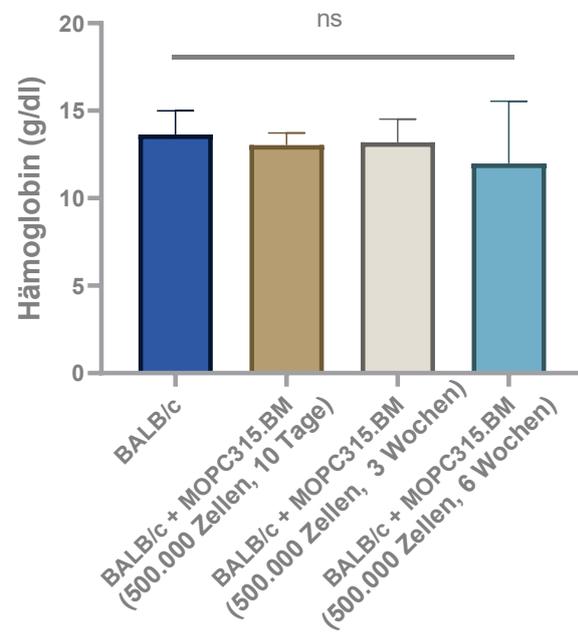
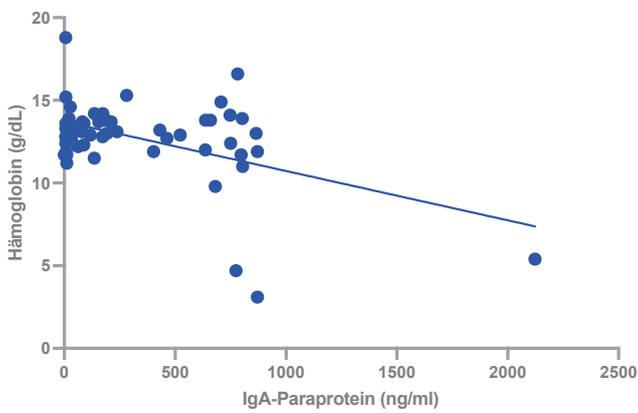
B**C**

Abbildung 5: Gemessene IgA-Paraprotein-Konzentration und der Einfluss auf das Diagnosekriterium der Anämie

Abbildung 5

A) Links:

Erythrozytenzahl ($10^6/\mu\text{l}$) in Abhängigkeit zur IgA-Paraprotein-Konzentration (n = 54)

$$r = -0,4508$$

$$R^2 = 0,2032$$

$$p = 0,0006$$

Rechts:

Vergleich Erythrozytenzahl ($10^6/\mu\text{l}$) von BALB/c (n = 10) mit BALB/c + MOPC315.BM (500.000 Zellen, 10 Tage Wartezeit n = 11), BALB/c + MOPC315.BM (500.000 Zellen, 3 Wochen Wartezeit n = 20) und BALB/c + MOPC315.BM (500.000 Zellen, 6 Wochen Wartezeit n = 14)

B) Links:

Hämatokrit in % in Abhängigkeit zur IgA-Paraprotein-Konzentration (n = 54)

$$r = -0,4993$$

$$R^2 = 0,2493$$

$$p = 0,0001$$

Rechts:

Vergleich Hämatokrit in % von BALB/c (n = 10) mit BALB/c + MOPC315.BM (500.000 Zellen, 10 Tage Wartezeit n = 11), BALB/c + MOPC315.BM (500.000 Zellen, 3 Wochen Wartezeit n = 20) und BALB/c + MOPC315.BM (500.000 Zellen, 6 Wochen Wartezeit n = 14)

C) Links: Hämoglobin (g/dl) in Abhängigkeit zur IgA-Paraprotein-Konzentration (n = 54)

$$r = -0,4793$$

$$R^2 = 0,2298$$

$$p = 0,0002$$

Rechts:

Vergleich Hämoglobin in g/dl von BALB/c (n = 10) mit BALB/c + MOPC315.BM (500.000 Zellen, 10 Tage Wartezeit n = 11), BALB/c + MOPC315.BM (500.000 Zellen, 3 Wochen Wartezeit n = 20) und BALB/c + MOPC315.BM (500.000 Zellen, 6 Wochen Wartezeit n = 14)

Bestimmung der Korrelationskoeffizienten mittels Pearson-Tests

Bestimmung der p-Werte mittels T-Tests: ns = nicht signifikant; * = < 0,05; ** = < 0,01; *** = < 0,001

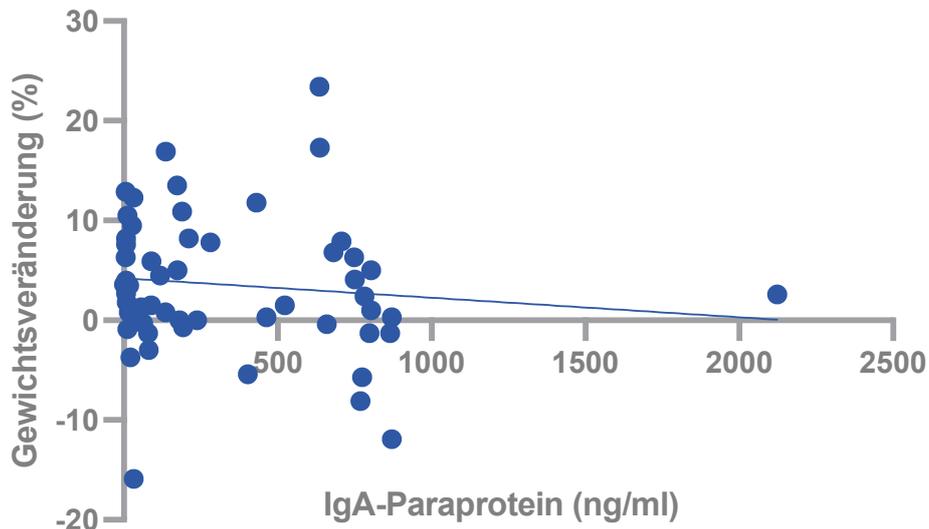


Abbildung 6: Gewichtsveränderung in Abhängigkeit zur IgA-Paraprotein-Konzentration (n = 54)

Abbildung 6

Gewichtsveränderung in Abhängigkeit zur IgA-Paraprotein-Konzentration

r	=	-0,1122
R ²	=	0,01258
p	=	0,4193

Bestimmung des Korrelationskoeffizienten mittels Pearson-Test

Da im Falle der mit MOPC315.36-injizierten Mäuse kein IgA-Paraprotein gemessen werden kann, wird der Allgemeinzustand anhand der injizierten Zellzahl und der darauffolgenden Wartezeit beurteilt. Um Anzeichen von Blutarmut feststellen zu können, wurden die Ergebnisse der injizierten Tiere unbehandelten BALB/c-Mäusen gegenübergestellt. Nach Injektion von 500.000 Zellen und einer Wartezeit von 3 Wochen konnte tendenziell eine Abnahme der Erythrozytenzahl, der Hämatokrit- und Hämoglobin-Werte festgestellt werden (Abbildung 7). Ein signifikantes Ergebnis wurde hierbei jedoch nicht ermittelt. Dies deckt sich dennoch mit der Beobachtung, dass wiederum in der Positivgruppe (BALB/c + MOPC315.BM) erst nach etwa 6 Wochen und IgA-Paraprotein-Konzentrationen von über 500 ng/ml eine deutliche Abnahme dieser Parameter verzeichnet werden konnte.

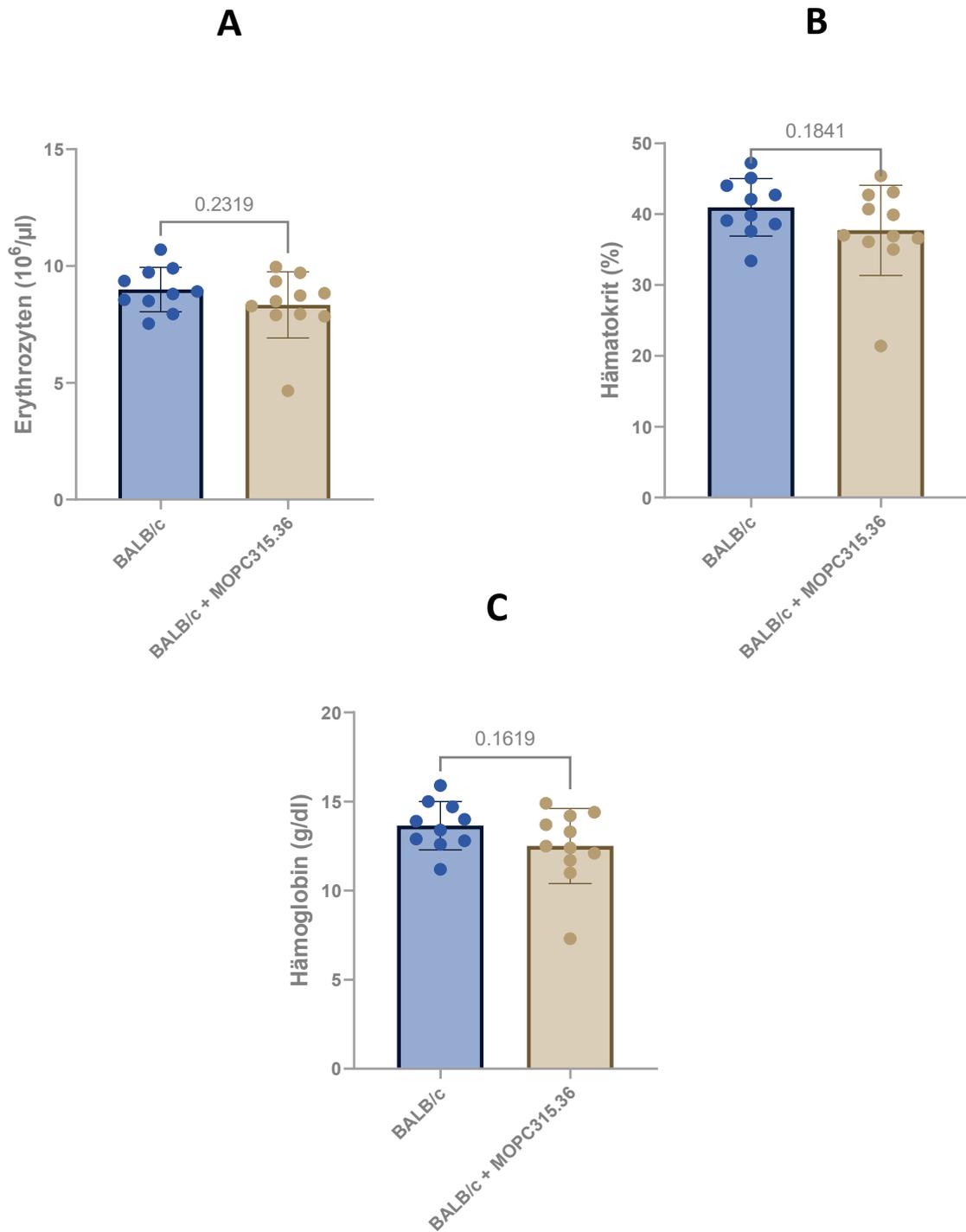


Abbildung 7: Veränderung der Erythrozytenzahl, der Hämatokrit- und Hämoglobin-Werte nach MOPC315.36-Injektion (500.000 Zellen, Wartezeit 3 Wochen)

Abbildung 7

- A) Vergleich Erythrozytenzahl ($10^6/\mu\text{l}$) von BALB/c (n = 10) mit BALB/c + MOPC315.36 (n = 11)
- B) Vergleich Hämatokrit (%) von BALB/c (n = 10) mit BALB/c + MOPC315.36 (n = 11)
- C) Vergleich Hämoglobin (g/dl) von BALB/c (n = 10) mit BALB/c + MOPC315.36 (n = 11)

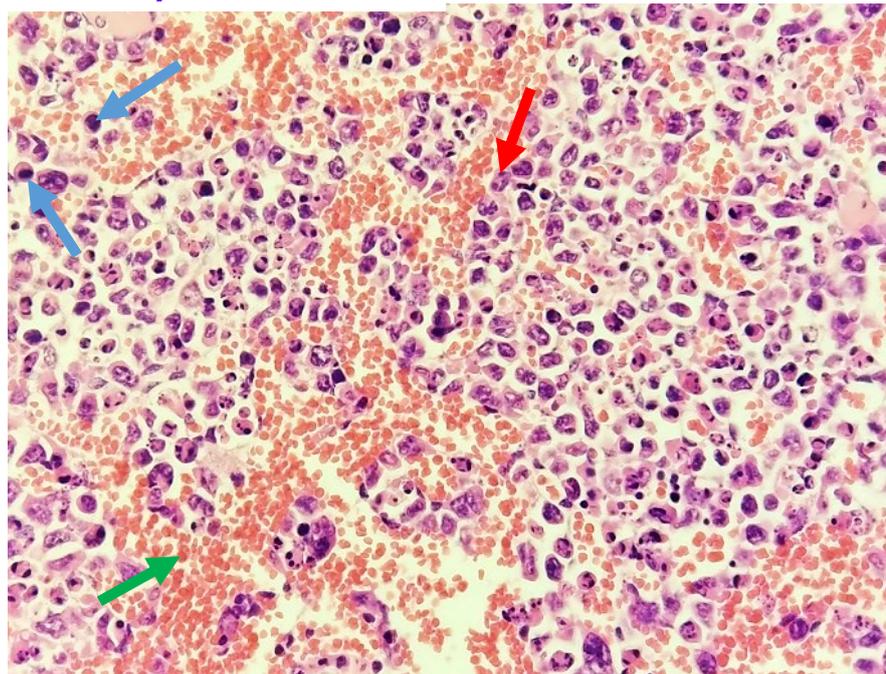
Bestimmung der p-Werte mittels T-Tests: ns = nicht signifikant; * = < 0,05; ** = < 0,01; *** = < 0,001

2.2 Ansiedlung der Myelomzellen im Knochenmark

Um das Ausmaß der Tumorinfiltration im Knochengewebe besser beurteilen zu können, sind Hämatoxylin-Eosin-Färbungen von Femora und der Wirbelsäule angefertigt worden. Hier exemplarisch dargestellt, konnte im Femur einer mit MOPC315.BM-injizierten BALB/c-Maus neoplastisches Gewebe auffindig gemacht werden. Wie zu erwarten war, waren in derselben Probe sowohl Anzeichen gewöhnlicher Hämatopoese als auch von Neoplasie zu finden. In Abbildung 8 A ist ein Beispiel eines sehr undifferenzierten Plasmozytoms dargestellt, was sich insbesondere anhand der dysmorphen, großen Zellkerne erkennen lässt. Es handelt sich hierbei um ein hochgradig atypisches, hyperzelluläres Knochenmark. Regelmäßige Hämatopoese ist nur noch fokal erhalten, erkennbar anhand einzelner Zellen der Erythropoese und der Granulopoese. In der Abbildung 8 B sind Anzeichen normaler Blutbildung zu sehen, welche hauptsächlich durch die Anhäufung kleiner, runder Nuklei von Erythroblasten beschrieben werden kann. Megakaryozyten, als Vorläuferzellen der Thrombozyten, sind anhand der deutlich größeren, segmentierten Zellkerne zu erkennen.

Hämatoxylin Eosin

A



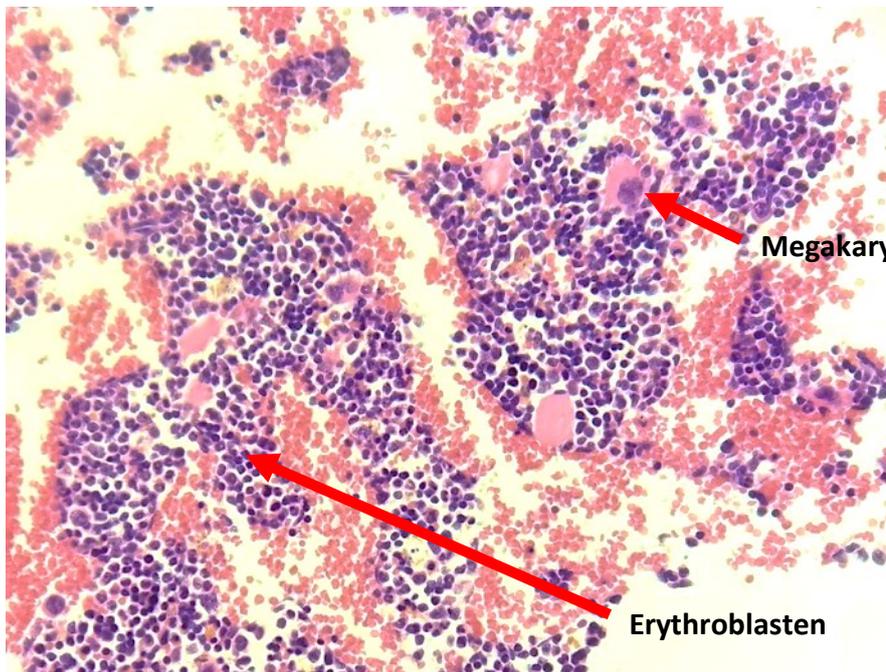
Proerythroblast/ Normoblast

Erythrozyt

Segmentkerniger Granulozyt

Hämatoxylin Eosin

B



Megakaryozyt

Erythroblasten

Abbildung 8: Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Femurs (400-fache Vergrößerung, Schnittdicke 4 µm)

Abbildung 8

BALB/c-Maus injiziert mit 250.000 Zellen MOPC315.BM.

A) Abbildung Knochengewebe mit Anzeichen der Neoplasie

B) Abbildung Knochengewebe mit Anzeichen normaler Hämatopoese

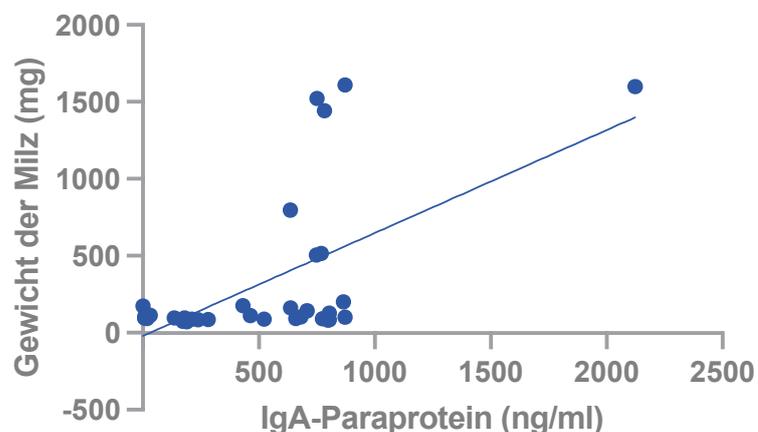
2.3 Extramedulläre Hämatopoese in der Milz nach Injektion der Myelomzellen

Als extramedulläre Hämatopoese wird die Blutbildung außerhalb des Knochenmarks bezeichnet [150]. Im Falle des Multiplen Myeloms kann dieser Vorgang unter anderem in den Geweben der Leber und der Milz stattfinden und wird generell mit einer schlechteren Prognose assoziiert [151]. In einer vorherigen Studie konnte bei allen querschnittsgelähmten BALB/c-Mäusen, die zuvor i.v.-Injektionen von jeweils 500.000 Zellen MOPC315.BM erhielten, sichtbares Tumorwachstum in der Milz verzeichnet werden [111].

Um den Vorgang der extramedullären Hämatopoese im MOPC-Mausmodell besser beurteilen zu können, wurden Proben der Milzen entnommen und makroskopisch sowie mikroskopisch auf Gewebsveränderungen untersucht. Anhand der Abbildungen 9 A und B ist zu erkennen, dass das Gewicht sowie die Größe der Milz mit der IgA-Paraprotein-Konzentration tendenziell ansteigen. Für beide Auswertungen ergeben sich signifikante Korrelationen, bestätigt durch die beiden Korrelationskoeffizienten von 0,5984 und 0,5589.

Zudem ist eine H&E-Gewebsfärbung aufgeführt, die exemplarisch das Phänomen der Splenomegalie aufzeigen soll (Abbildung 10). Hier wird nochmals deutlich, dass neoplastische Areale neben gesunden Gewebsbereichen auftreten: Die Neoplasie kann hier durch vernarbtes, nekrotisches Gewebe charakterisiert werden (verdeutlicht durch schwarze Pfeile), wohingegen die nicht-betroffenen Areale durch rundlich-einheitliche Zellkerne zu erkennen sind (verdeutlicht durch blaue Pfeile).

A



B

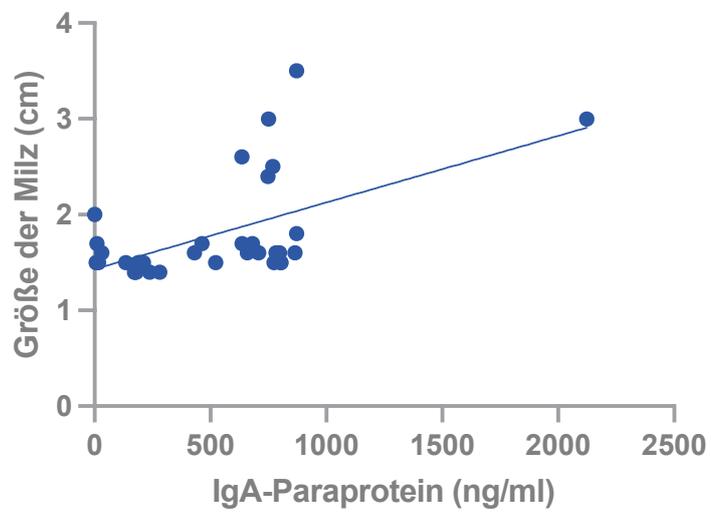


Abbildung 9: Gewicht und Größe der Milz in Abhängigkeit zur IgA-Paraprotein-Konzentration (n = 35)

Abbildung 9

Gewicht (A) und Größe (B) der Milz in Abhängigkeit zur IgA-Paraprotein-Konzentration

A) r	=	0,5984
R ²	=	0,03580
p	=	0,0001
B) r	=	0,5589
R ²	=	0,3123
p	=	0,0005

Bestimmung der Korrelationskoeffizienten mittels Pearson-Tests

Hämatoxylin Eosin

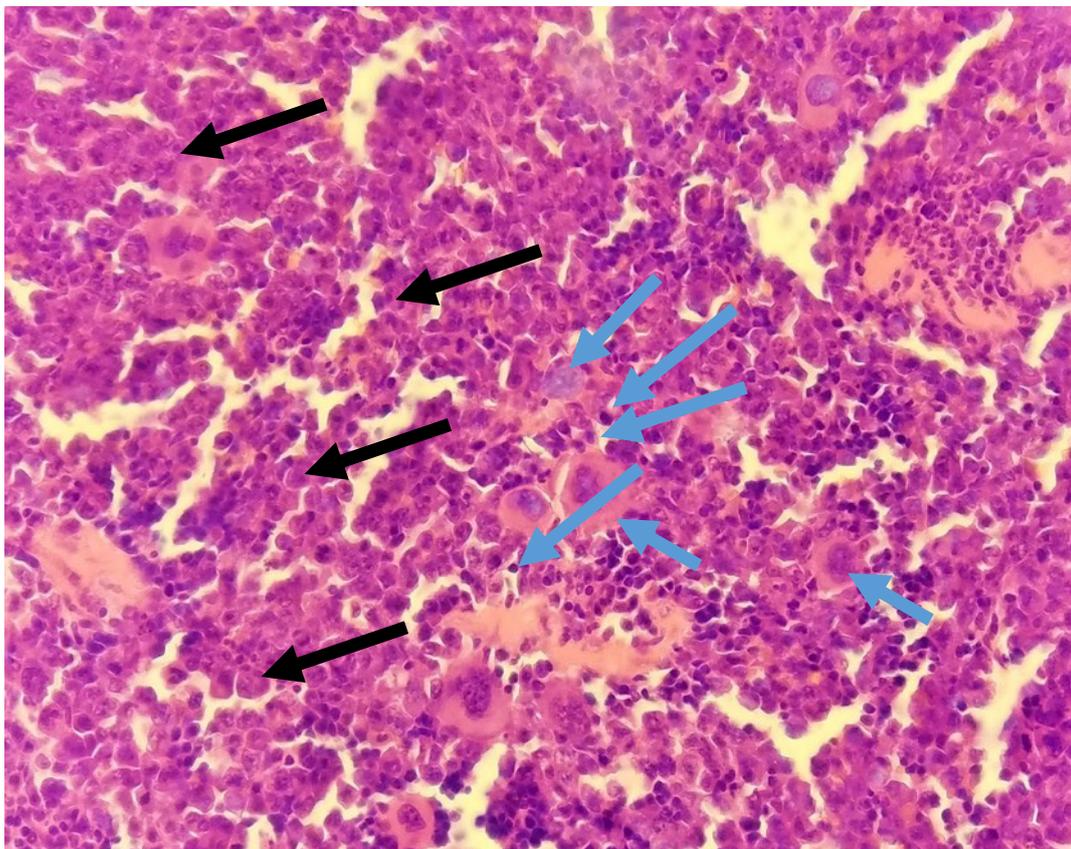


Abbildung 10: Hämatoxylin-Eosin-Färbung einer Milz (400-fache Vergrößerung, Schnittdicke 4 µm)

Abbildung 10

BALB/c-Maus injiziert mit 250.000 Zellen MOPC315.BM. Das Tier wies Splenomegalie auf (Milzgröße: 4 cm, Milzgewicht: 2236 mg)

- Die schwarzen Pfeile verdeutlichen neoplastisches, vernarbtes Gewebe
- Die blauen Pfeile verdeutlichen normale, unauffällige Hämatopoese (Megakaryozyten erkennbar)

Auch im Falle der mit MOPC315.36-injizierten Mäuse kann beobachtet werden, dass tendenziell eine Zunahme des Milzgewichts und der Milzgröße stattfindet: Im Vergleich zu unbehandelten BALB/c-Mäusen nimmt das Gewicht der Milz nach Injektion von 500.000 Zellen und einer Wartezeit von 3 Wochen durchschnittlich um 16 % zu, die Größe steigt wiederum durchschnittlich um 7 % an (Abbildung 11). Ein signifikantes Ergebnis konnte in beiden Fällen jedoch nicht ermittelt werden.

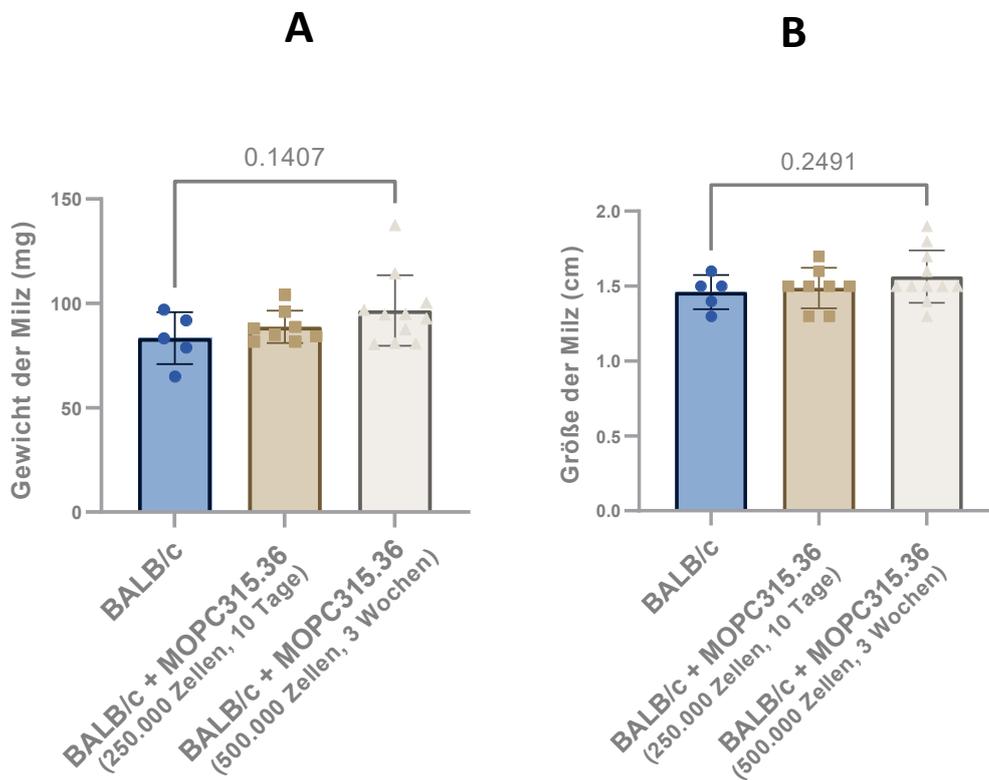


Abbildung 11: Veränderung des Milzgewichts und der Milzgröße nach MOPC315.36-Injektion

Abbildung 11

- A) Vergleich Milzgewicht in cm von BALB/c (n = 5) mit BALB/c + MOPC315.36 (250.000 Zellen, 10 Tage Wartezeit, n = 8) und BALB/c + MOPC315.36 (500.000 Zellen, 3 Wochen Wartezeit, n = 11)
- B) Vergleich Milzgröße in mg von BALB/c (n = 5) mit BALB/c + MOPC315.36 (250.000 Zellen, 10 Tage Wartezeit, n = 8) und BALB/c + MOPC315.36 (500.000 Zellen, 3 Wochen Wartezeit, n = 11)

Bestimmung der p-Werte mittels T-Tests: ns = nicht signifikant; * = < 0,05; ** = < 0,01; *** = < 0,001

In Anbetracht der Annahme, dass es infolge der extramedullären Hämatopoese in der Milz zu einer Vermehrung bestimmter Blutzellen kommt, war es wichtig, diese zu identifizieren und in Abhängigkeit zur IgA-Paraprotein-Konzentration zu setzen. Im Blutbild der mit MOPC315.BM-injizierten Mäuse konnte festgestellt werden, dass es mit steigender IgA-Paraprotein-Konzentration zu einer signifikanten Zunahme von Lymphozyten und Monozyten kam. Eine signifikante Korrelation konnte in beiden Fällen bestätigt werden (Abbildung 12).

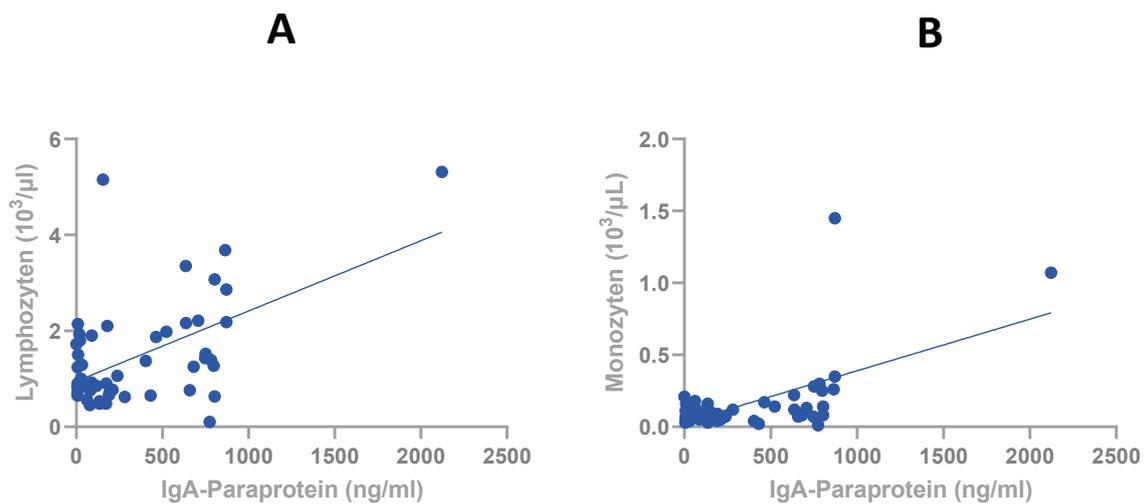


Abbildung 12: Lymphozyten- ($10^3/\mu\text{l}$) und Monozytenzahl ($10^3/\mu\text{l}$) in Abhängigkeit zur IgA-Paraprotein-Konzentration ($n = 54$)

Abbildung 12

(A) Lymphozyten- ($10^3/\mu\text{l}$) und (B) Monozytenzahl ($10^3/\mu\text{l}$) in Abhängigkeit zur IgA-Paraprotein-Konzentration

A) $r = 0,5417$
 $R^2 = 0,2934$
 $p = < 0,0001$

B) $r = 0,6083$
 $R^2 = 0,3700$
 $p = < 0,0001$

Bestimmung der Korrelationskoeffizienten mittels Pearson-Tests

3. Ausbildung von NETs nach Inkubation von Neutrophilen mit IgA-Paraprotein

Um einen möglichen Einfluss des IgA-Paraproteins auf neutrophile Granulozyten zu untersuchen, wurden NETose-Versuche durchgeführt. Hierbei wurden Neutrophile über mehrere Stunden hinweg mit verschiedenen Zellkulturüberständen versetzt, welche unterschiedliche Konzentrationen an IgA-Paraprotein enthielten. Die Zellkulturüberstände der MOPC315.36-Zelllinie, welche somit kein IgA-Paraprotein enthielten, wurden als Kontrolle verwendet und mit den Zellkulturüberständen der MOPC315.BM-Zelllinie verglichen. Das MOPC315-Medium diente als Referenz. Als Positivkontrolle wurde die NETose-fördernde Substanz PMA in einer Konzentration von 1000 nM verwendet.

Im Falle der mit PMA versetzten Zellen konnten bei etwa 20 % aller Neutrophilen NETs nachgewiesen werden. Wie aus dem Graphen ersichtlich, ging zudem vom MOPC315-Medium selbst keine Aktivierung der Neutrophilen aus. Auch bei den Zellen, die mit den Zellkulturüberständen der MOPC315.36-Zelllinie versetzt worden sind, konnten nur wenige NETs festgestellt werden. Durchschnittlich nur 2 % aller neutrophilen Granulozyten bildeten nach Inkubation mit den an IgA-Paraprotein-mangelnden Kulturüberständen extrazelluläre Fallen aus. Im Vergleich zu den Negativkontrollen konnte bei den mit IgA-Paraprotein angereicherten Neutrophilen vermehrt NETose festgestellt werden. Dabei schien der Zellkulturüberstand mit 295 ng/ml IgA-Paraprotein den größten Effekt zu haben, etwa 24 % aller Zellen erfuhren eine Aktivierung. Paradoxerweise konnte keine von IgA-Paraprotein konzentrationsabhängige Neutrophilen-Aktivierung verzeichnet werden. Zwar kam es auch bei höheren Konzentrationen im Vergleich zu den Negativkontrollen zur vermehrten NET-Bildung, jedoch fiel diese geringer aus als im ersten Fall. Ein signifikantes Ergebnis konnten zwischen den mit MOPC315-Medium und PMA 1000 nM versetzten Zellen verzeichnet werden. Auch zwischen zwei der mit IgA-Paraprotein angereicherten Neutrophilen und der MOPC315.36-Kontrolle ergaben sich signifikante Unterschiede.

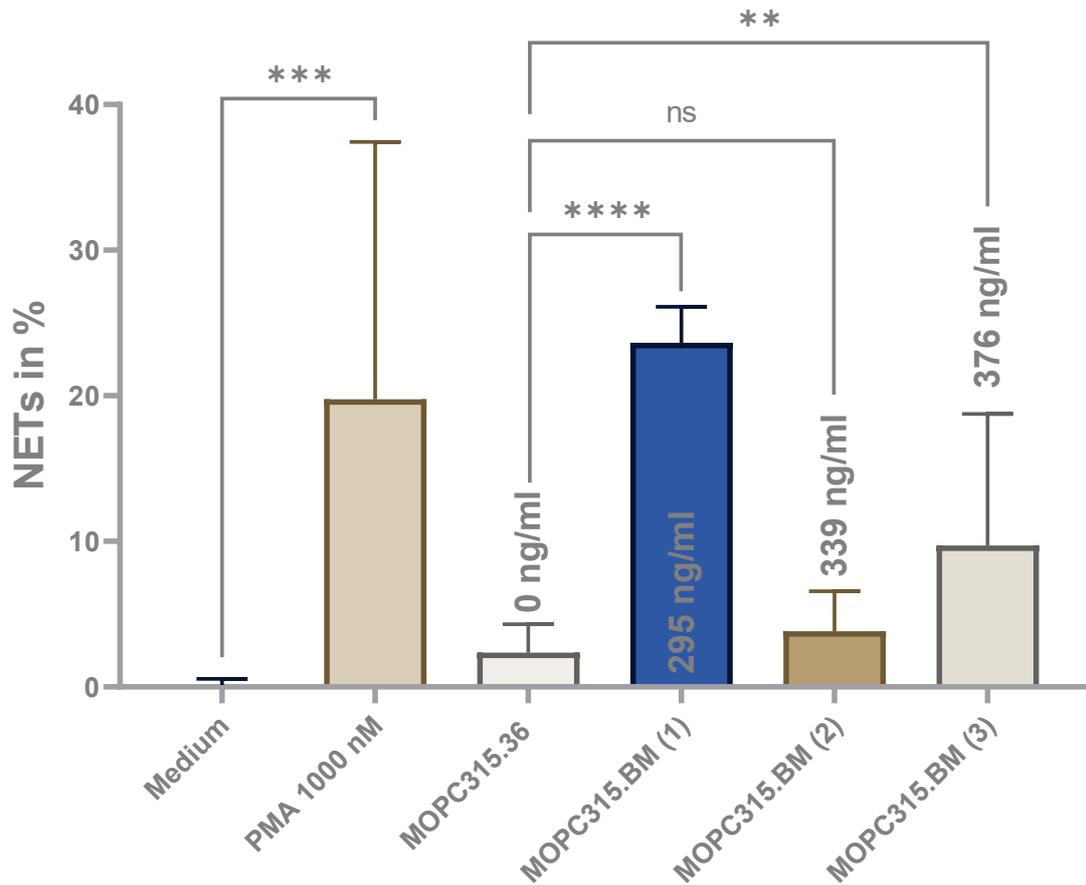


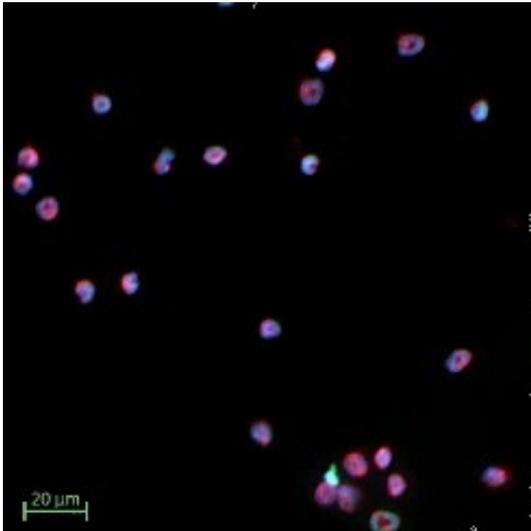
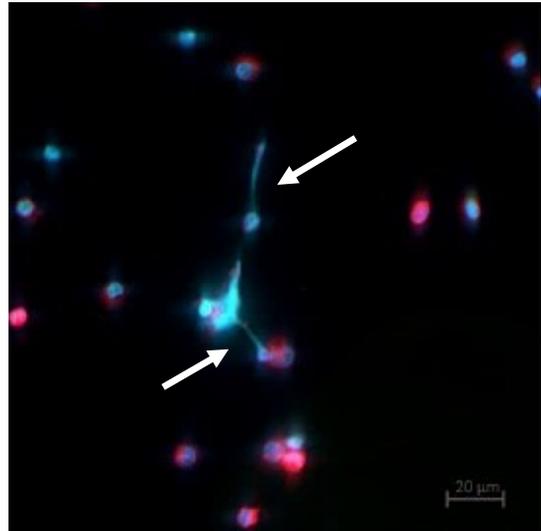
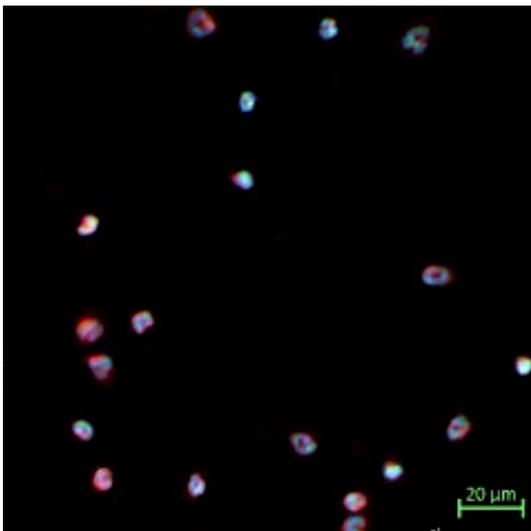
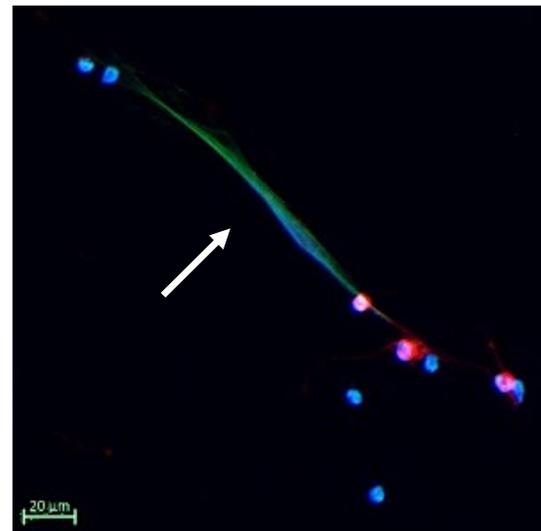
Abbildung 13: Einfluss von IgA-Paraprotein auf Neutrophile

Abbildung 13

Als Negativkontrolle dienten isolierte Neutrophile, die mit MOPC315-Medium versetzt worden sind. Als Positivkontrolle diente PMA 1000 nM. Untersucht wurde der Einfluss von IgA-Paraprotein aus verschiedenen Zellkulturüberständen von MOPC315.BM.

- 250.000 Neutrophile + MOPC315-Medium (n = 3)
- 250.000 Neutrophile + PMA 1000 nM (n = 2)
- 500.000 Neutrophile + MOPC315.36-Zellkulturüberstand (0 ng/ml IgA-Paraprotein; n = 3)
- 500.000 Neutrophile + MOPC315.BM-Zellkulturüberstand (295 ng/ml IgA-Paraprotein; n = 1)
- 500.000 Neutrophile + MOPC315.BM-Zellkulturüberstand (339 ng/ml IgA-Paraprotein; n = 1)
- 500.000 Neutrophile + MOPC315.BM-Zellkulturüberstand (376 ng/ml IgA-Paraprotein; n = 2)

Bestimmung der p-Werte mittels T-Tests: ns = nicht signifikant; * = < 0,05; ** = < 0,01; *** = < 0,001

A**MPO Sytox Green Hoechst***MOPC315-Medium (Negativkontrolle)***B****MPO Sytox Green Hoechst***PMA 1000 nM (Positivkontrolle)***C****MPO Sytox Green Hoechst***MOPC315.36-Zellkulturüberstand (enthält kein IgA-Paraprotein)***D****MPO Sytox Green Hoechst***MOPC315.BM-Zellkulturüberstand (enthält IgA-Paraprotein)***Abbildung 14: vermehrte NET-Bildung nach Einfluss von IgA-Paraprotein auf Neutrophile****Abbildung 14**

Dreifachfärbung mit Myeloperoxidase (rot), Sytox Green (grün) und Hoechst (blau) zur Charakterisierung von NETs (Maßstab = 20 µm). Ausbildung von NETs sind gekennzeichnet durch die weißen Pfeile.

- A) Neutrophile + MOPC315-Medium (Negativkontrolle)
- B) Neutrophile + PMA 1000 nM (Positivkontrolle)
- C) Neutrophile + MOPC315.36-Zellkulturüberstand (0 ng/ml IgA-Paraprotein)
- D) Neutrophile + MOPC315.BM-Zellkulturüberstand (376 ng/ml IgA-Paraprotein)

4. Erhöhte thrombozytäre ATP-Freisetzung nach Inkubation mit MOPC315-Zellkulturüberständen

Um eine direkte Auswirkung von IgA-Paraprotein auf aktivierte Thrombozyten untersuchen zu können, wurden Aggregometrierversuche durchgeführt. Hierbei diente das MOPC315-Medium und der Zellkulturüberstand von MOPC315.36 als Kontrolle des Versuchsaufbaus. Im Vergleich zum MOPC315-Medium konnte nach Inkubation der Thrombozyten mit den Zellkulturüberständen eine signifikante Erhöhung der ATP-Freisetzung verzeichnet werden. Dieser Effekt konnte allerdings nicht auf Ebene der Aggregation, welche sich folglich aus den jeweiligen AUC-Werten ergibt, bestätigt werden: Zwar kam es nach Zugabe der Zellkulturüberstände in beiden Fällen tendenziell zu einer Erhöhung der Aggregation, jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede ausgemacht werden. Wie in Abbildung 15 A ersichtlich, ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der ATP-Freisetzung hinsichtlich des Vorhandenseins des IgA-Paraproteins.

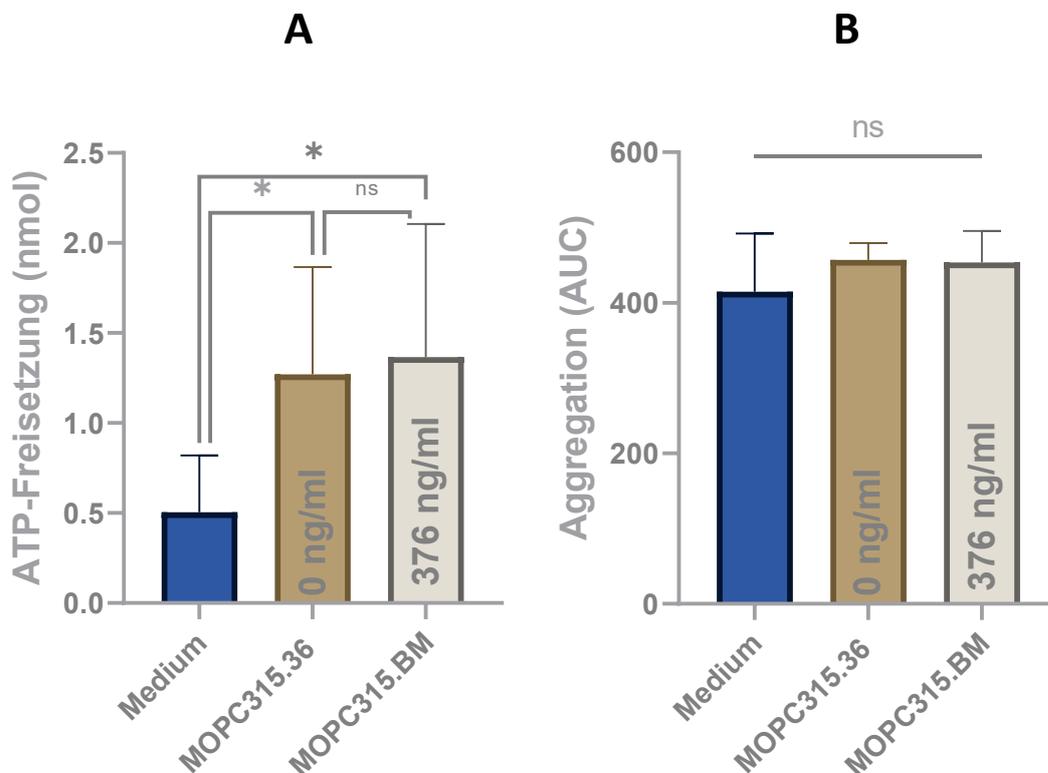


Abbildung 15: Einfluss von IgA-Paraprotein auf Thrombozyten

Abbildung 15

ATP-Freisetzung (A) und Ausmaß der Aggregation (B) von Thrombozyten nach Inkubation mit IgA-Paraprotein

- Thrombozyten + MOPC315-Medium (Negativkontrolle; n = 5)
- Thrombozyten + MOPC315.36-Zellkulturüberstand (0 ng/ml IgA-Paraprotein; n = 8)
- Thrombozyten + MOPC315.BM-Zellkulturüberstand (376 ng/ml IgA-Paraprotein n = 8)

Bestimmung der p-Werte mittels T-Tests: ns = nicht signifikant; * = < 0,05; ** = < 0,01; *** = < 0,001

5. Einfluss von IgA-Paraprotein auf das Thrombosemodell

5.1 Reduktion der Monozytenzahl im Thrombus

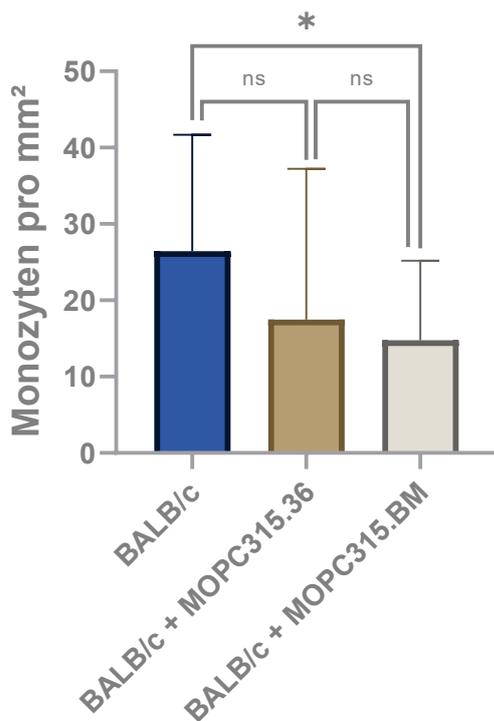
Über eine immunhistologische Auswertung der entnommenen Thromben (BALB/c; BALB/c + MOPC315.BM; BALB/c + MOPC315.36) sollte der Einfluss des IgA-Paraproteins auf deren Zusammensetzung untersucht werden. Die verschiedenen Immunfluoreszenzfärbungen zielten hierbei auf eine Erfassung von Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und Monozyten ab, um Rückschlüsse auf deren Verteilung im Thrombus sowie auf die Thrombusentstehung im MOPC-Mausmodell ziehen zu können. Die Thromben der Positivgruppe (BALB/c + MOPC315.BM) und der Kontrollgruppe (BALB/c + MOPC315.36) wurden mit Thromben unbehandelter BALB/c-Mäuse verglichen, um einerseits die Auswirkung des MOPC-Mausmodells auf die Thrombuszusammensetzung zu untersuchen und andererseits zu bestimmen, ob das Vorhandensein von IgA-Paraprotein hierbei einen Unterschied bewirkt. In die Positivgruppe wurden ausschließlich Thromben von Mäusen aufgenommen, die eine IgA-Paraprotein-Konzentration von mindestens 100 ng/ml aufwiesen, um den Einfluss weiterer möglicher Faktoren auf die Thrombuszusammensetzung ausschließen zu können.

Mithilfe der F4/80-Färbungen konnte die Anzahl der Monozyten pro Thrombusfläche ausgewertet werden. Bemerkenswert ist hierbei, dass es im Unterschied zu den Monozytenzahlen im Blut scheinbar zu einem gegenteiligen Effekt kam: Innerhalb des Thrombus konnte eine signifikante Reduktion der Monozytenzahl in der Positivgruppe (BALB/c + MOPC315.BM) im Vergleich zur unbehandelten Gruppe (BALB/c) festgestellt werden. Die Monozytenzahl sank hier im Vergleich zur unbehandelten Gruppe um etwa 44 %.

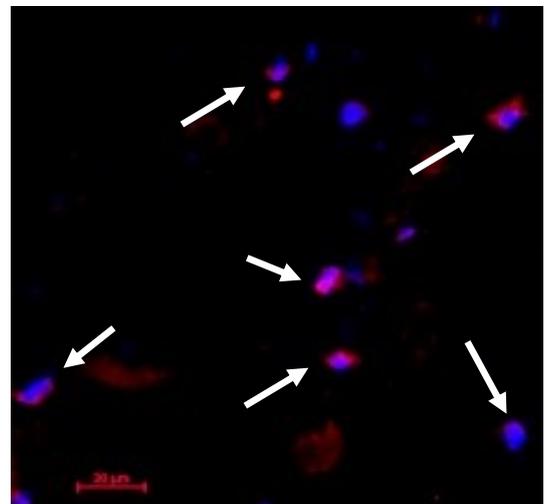
Zwar konnte auch bei den Thromben der Kontrollgruppe eine Tendenz zur Reduktion beobachtet werden, jedoch ergab sich hieraus kein signifikantes Ergebnis.

Kein Unterschied konnte bei der Auswertung der CD41-positiven Thrombusfläche ausgemacht werden. In allen drei Gruppen betrug der Anteil von Thrombozyten an der Gesamtfläche des Thrombus etwa 20 %. Um wiederum die Beteiligung von Neutrophilen an der Thrombuszusammensetzung untersuchen zu können, wurden Kombinationsfärbungen durchgeführt, die auf eine Detektion von Ly6G und MPO abzielten. Da eine Aktivierung von Neutrophilen unter anderem durch die Freisetzung von NETs zu erkennen ist, wurden auch diese ausgezählt und in Relation zur gesamten Thrombusfläche gesetzt: Weder konnte eine Veränderung der Neutrophilenzahl noch eine veränderte Freisetzung von NETs innerhalb der Thromben festgestellt werden.

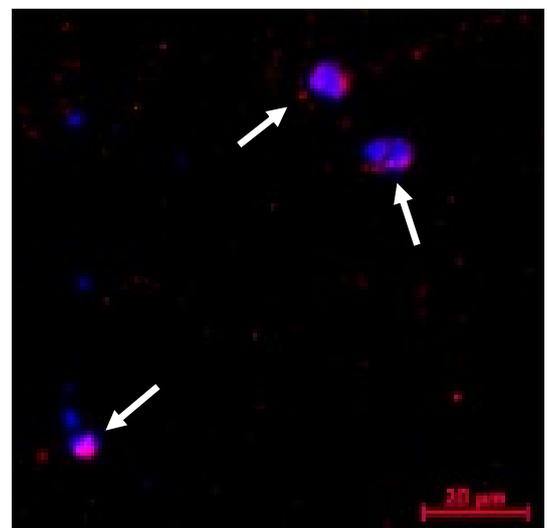
A



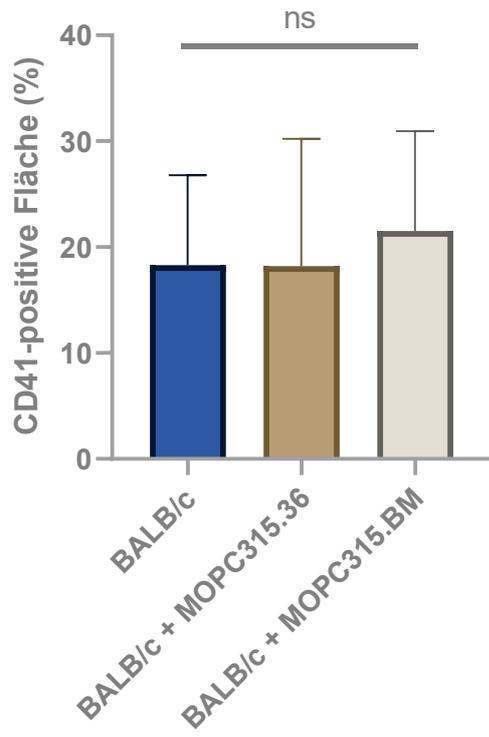
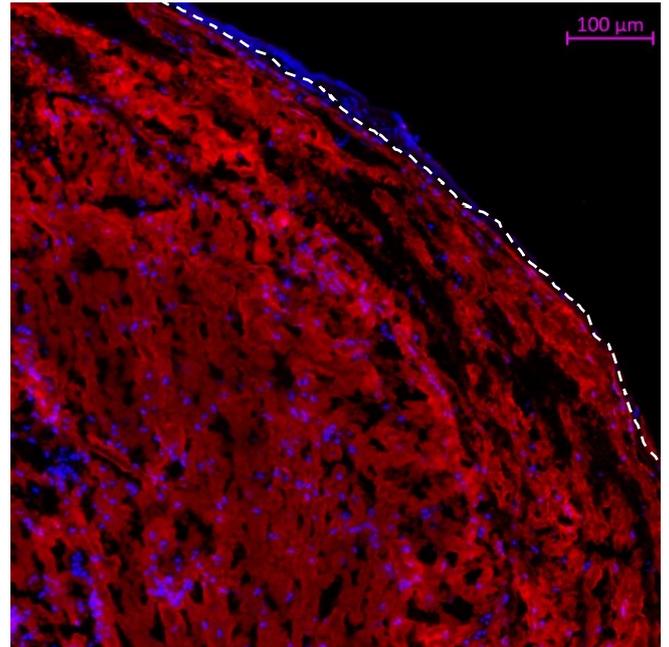
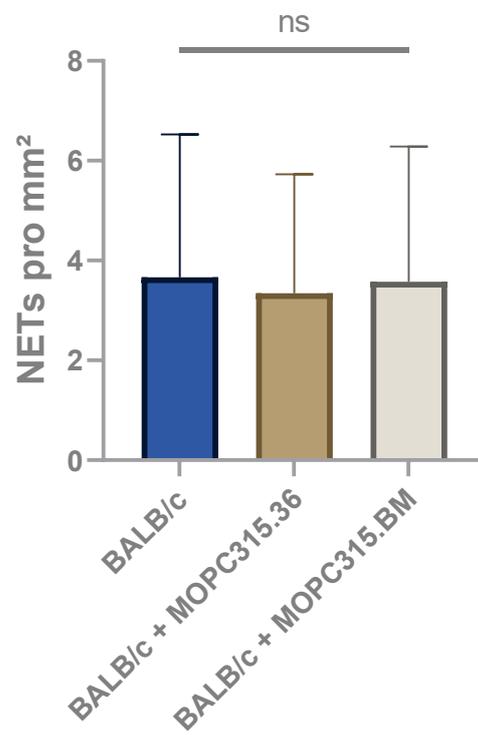
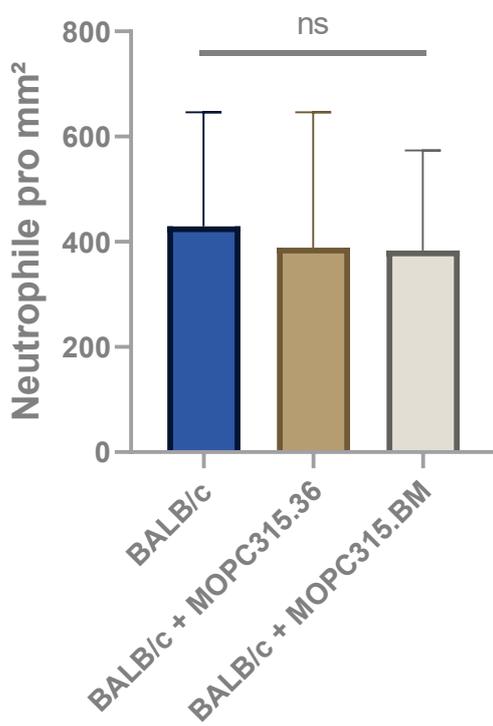
F4/80 **Hoechst**



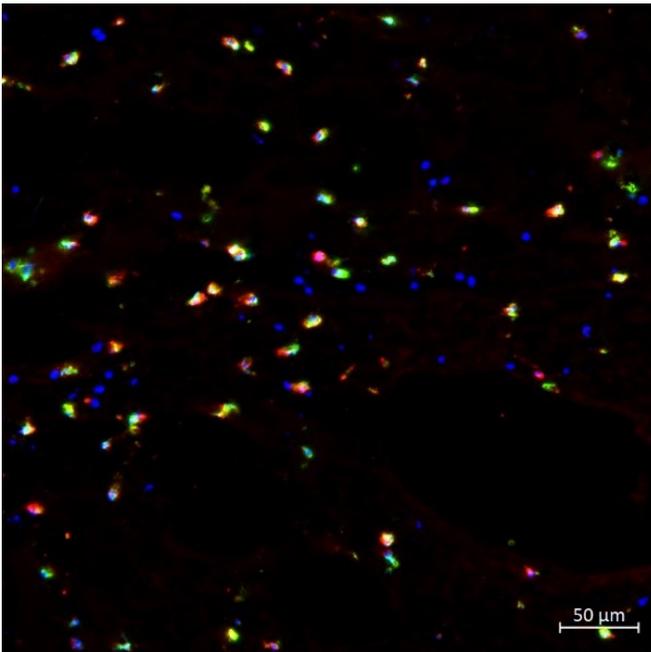
BALB/c (unbehandelt)



BALB/c + MOPC315.BM (Positivgruppe)

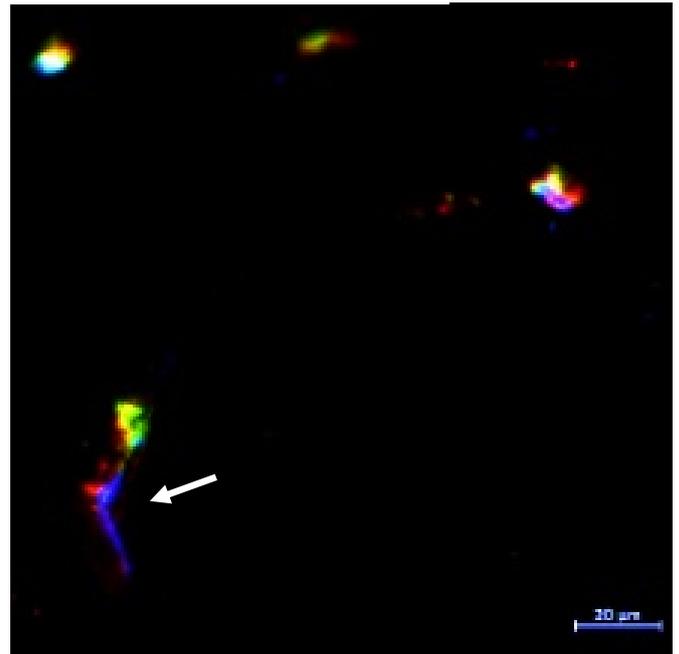
B**CD41 Hoechst***BALB/c + MOPC315.BM (Positivgruppe)***C**

Ly6G MPO Hoechst



BALB/c + MOPC315.BM (Positivgruppe)

Ly6G MPO Hoechst



BALB/c + MOPC315.BM (Positivgruppe)

Abbildung 16: Einfluss von IgA-Paraprotein auf die Thrombuskomposition

Abbildung 16

- A) Monozyten pro mm^2 : ausgewertete Thromben von unbehandelten BALB/c-Mäusen ($n = 10$), BALB/c + MOPC315.36 ($n = 9$) und BALB/c + MOPC315.BM ($n = 12$).
Rechts oben Ausschnitt eines Thrombus einer unbehandelten BALB/c-Maus, rechts unten Ausschnitt eines Thrombus einer BALB/c-Maus injiziert mit MOPC315.BM (IgA-Paraprotein-Konzentration von 180 ng/ml). Doppelgefärbte Monozyten wurden durch weiße Pfeile markiert. Maßstab = 20 μm
- B) CD41-positive Fläche in Relation zur Gesamtfläche des Thrombus: ausgewertete Thromben von unbehandelten BALB/c-Mäusen ($n = 7$), BALB/c + MOPC315.36 ($n = 10$) und BALB/c + MOPC315.BM ($n = 12$).
Rechts oben Ausschnitt eines Thrombus einer BALB/c-Maus injiziert mit MOPC315.BM (IgA-Paraprotein-Konzentration von 174 ng/ml). Endothel markiert durch gestrichelte Linie. Maßstab = 100 μm
- C) Neutrophile und NETs pro mm^2 : ausgewertete Thromben von unbehandelten BALB/c-Mäusen ($n = 8$), BALB/c + MOPC315.36 ($n = 9$) und BALB/c + MOPC315.BM ($n = 11$).
Links oben Ausschnitt eines Thrombus einer BALB/c-Maus injiziert mit MOPC315.BM (IgA-Paraprotein-Konzentration von 238 ng/ml) Maßstab = 50 μm
Rechts oben Ausschnitt eines Thrombus einer BALB/c-Maus injiziert mit MOPC315.BM (IgA-Paraprotein-Konzentration von 180 ng/ml). Weißer Pfeil deutet auf Ausbildung eines NETs hin. Maßstab = 20 μm

Bestimmung der p-Werte mittels T-Tests: ns = nicht signifikant; * = $< 0,05$; ** = $< 0,01$; *** = $< 0,001$

5.2 IgA-Paraprotein übt keinen Einfluss auf Thrombusgewicht und -inzidenz aus

Die Hypothese, dass das von den Myelomzellen hergestellte IgA-Paraprotein einen prothrombotischen Effekt aufweist, sollte mithilfe des DVT-Operationsverfahrens überprüft werden. Dabei wurden das Thrombusgewicht sowie die Thromboseinzidenz unbehandelter BALB/c-Mäuse mit den injizierten BALB/c-Mäusen verglichen. Hierbei dienten die mit MOPC315.36-injizierten BALB/c-Mäuse als Kontrollgruppe.

In Abbildung 17 A ist zu sehen, dass sich zwischen den drei Gruppen keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Thrombusgewichts ergaben. Das durchschnittliche Thrombusgewicht der unbehandelten Gruppe (BALB/c) betrug 14,8 mg. Im Vergleich hierzu konnte ein leicht reduziertes mittleres Thrombusgewicht von 12,7 mg in der Kontrollgruppe (BALB/c + MOPC315.36) und von 13,3 mg in der Positivgruppe (BALB/c + MOPC315.BM) festgestellt werden. Entgegen den Erwartungen wurde im Vergleich zur unbehandelten Gruppe in der Positivgruppe eine reduzierte Thromboseinzidenz verzeichnet. Die hohe Thromboseinzidenz unbehandelter BALB/c-Mäuse betrug bereits 80 %, was erfahrungsgemäß im Rahmen des DVT-Operationsverfahrens bei dieser Mauslinie ein durchaus realistischer Wert war. Umso überraschender war es, dass es trotz Injektion der MOPC-Zellen in beiden Gruppen zu einer Reduktion der Thromboseinzidenz kam. Die Inzidenz lag in der Kontrollgruppe bei 55 % und in der Positivgruppe bei 46 %. Um den Einfluss des IgA-Paraproteins auf das Thrombusgewicht und auf die Thromboseinzidenz zu untersuchen, wurde zusätzlich eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Wie anhand von Abbildung 17 B ersichtlich, ergab sich folglich kein Zusammenhang zwischen der IgA-Paraprotein-Konzentration und vermehrter Thrombusbildung. Dies wurde durch den Korrelationskoeffizienten bestätigt, der annähernd den Wert Null annahm. Aus diesen Ergebnissen lässt sich somit ableiten, dass IgA-Paraprotein in diesem Versuchsaufbau keinen Einfluss auf die Thrombusbildung nimmt.

Abbildung 17

A) Vergleich des durchschnittlichen Thrombusgewichts und der Thromboseinzidenz

- unbehandelte BALB/c-Mäuse (n = 10)
- BALB/c + MOPC315.36 (500.000 Zellen, 3 Wochen Wartezeit, n = 11)
- BALB/c + MOPC315.BM (500.000 Zellen, 3 Wochen Wartezeit, n = 22)

B) Festgestelltes Thrombusgewicht in Abhängigkeit zur IgA-Paraprotein-Konzentration (n = 52)

$$r = 0,03927$$

$$R^2 = 0,001542$$

$$p = 0,7823$$

Bestimmung der p-Werte mittels T-Tests: ns = nicht signifikant; * = < 0,05; ** = < 0,01; *** = < 0,001

Bestimmung des Korrelationskoeffizienten mittels Pearson-Tests

V. Diskussion

1. Beurteilung des MOPC-Mausmodells zur Abbildung des Multiplen Myeloms

Anhand der vorgestellten Ergebnisse soll beurteilt werden, inwiefern eine Übertragung der humanen Myelom-Erkrankung auf das MOPC-Mausmodell möglich ist und welche Grenzen dem Modell anhaften.

Auch heute noch werden klassischerweise die sogenannten CRAB-Kriterien zur Sicherstellung einer Diagnose herangezogen [103]. In dem vorgestellten Mausmodell beschränkte sich die Überprüfung der genannten Diagnosekriterien hauptsächlich auf die Parameter Anämie sowie Knochenbeteiligung. Mit steigender IgA-Paraprotein-Konzentration konnte eine tendenzielle Abnahme der Erythrozytenzahl, Hämoglobin- sowie der Hämatokrit-Werte festgestellt werden. Durch die Berechnung signifikanter Korrelationen kann von einem Zusammenhang ausgegangen werden, auch wenn aufgrund mangelnder Referenzwerte in der Fachliteratur für BALB/c-Mäuse jedoch nicht eindeutig bestimmt werden kann, ab wann eine Blutarmut tatsächlich vorliegt. Eine Knochenbeteiligung konnte in diesem Modell anhand von histologischen Schnitten der Femora und der Wirbelsäulen bestätigt werden. Neoplastische Strukturen im Knochengewebe sind auf eine Integration der injizierten Myelomzellen im Knochenmark zurückzuführen, von wo aus sie sich vermehren und zur Produktion von monoklonalem Paraprotein führen. Der Anstieg von Lymphozyten im Blut der betroffenen Mäuse korreliert mit der IgA-Paraprotein-Konzentration, was ebenfalls auf eine Vermehrung IgA-Paraprotein-produzierender B-Zellen schließen lässt. Da die IgA-Paraprotein-Konzentrationen im Vergleich zur Erstpublikation erst zu einem späteren Zeitpunkt deutlich anstiegen, mussten die injizierte Zellzahl sowie die darauffolgende Wartezeit angepasst werden. Durch eine standardisierte Durchführung der i.v.-Injektionen wurden Injektionsfehler weitgehend vermieden, jedoch konnten sie sicherlich nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurden bereits zu Beginn der Versuchsreihen höhere Zellzahlen (250.000 Zellen pro Maus) injiziert. Ein Grund für die im Vergleich zur Erstpublikation verzögerte Krankheitsausbildung nach Injektion könnte auf eine verminderte Effektivität der verwendeten MOPC315-Zellen hinweisen: Bevor die Zellen einen stabilen, teilungsfähigen Zustand erlangten und anschließend injiziert werden konnten, durchliefen die Zellkulturen

teilweise mehrere Zellpassagen, die die Zellaktivität unter Umständen negativ beeinflusst haben könnten.

Wie bereits Hofgaard et al. feststellten, konnte bei den mit MOPC315.BM-injizierten Mäusen ein Wachstum der Milz verzeichnet werden [111]. Tatsächlich sind auch Patientenfälle bekannt, bei denen die Ausbildung einer Splenomegalie eine Myelomerkrankung zugrunde lag [152, 153]. In zwei beschriebenen Fällen handelte es sich um ein IgA-produzierendes Plasmozytom [153]. Die durchgeführten Korrelationsanalysen lassen schließlich in unserem Fall auf einen Zusammenhang zwischen steigender IgA-Paraprotein-Konzentration und dem vermehrten Wachstum der Milz schließen. Die histologische Aufarbeitung bestätigte den Verdacht auf Neoplasie in den entsprechenden Milzgeweben. Mit steigender IgA-Paraprotein-Konzentration fand sich im Blut der Versuchstiere zudem eine vermehrte Anhäufung von Monozyten. Das Phänomen der Monozytose kann ebenfalls bei humanen Plasmazellerkrankungen auftreten und ist bei Myelom-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose mit einem schwerwiegenderen Erkrankungsverlauf assoziiert [154]. Ebenso wird beschrieben, dass aus Monozyten hervorgehende Tumor-assoziierte Makrophagen mit einer Wachstums-, Angiogenese- und Metastaseförderung verschiedener Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht werden können. Im Falle des Multiplen Myeloms werden Makrophagen des Knochenmarks angiogenesefördernde und antiapoptotische Effekte auf Myelomzellen zugesprochen, was auch künftig einen möglichen Angriffspunkt zur Angiogenesetherapie darstellen könnte [155-157].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich das MOPC-Modell als eine durchaus praktikable Methode bewährt hat, um die Erkrankung des Multiplen Myeloms im Mausmodell abbilden zu können. Das MOPC-Mausmodell zeichnet sich grundsätzlich durch eine vergleichsweise einfache und schnelle Umsetzbarkeit aus, da die Zellen nach ausreichender Kultivierung und Abtrennung vom Kulturmedium direkt per i.v.-Injektion gespritzt werden können. Weitere, in der Fachliteratur beschriebene Mausmodelle sind teilweise an aufwändige und langwierige Herstellungsverfahren geknüpft. Hierzu gehören beispielsweise Xenograft-Modelle immundefizienter Mäuse, die sich Linien humaner Myelomzellen bedienen. Mausmodelle, die auf Injektionen der murinen 5T-Zelllinien beruhen, haben den Nachteil der eingeschränkten Verfügbarkeit der Mauslinie C57BL/KaLwRij [111, 112, 158]. Es zeigte sich, dass der Erkrankungsfortschritt zuverlässig über eine Messung der IgA-Paraprotein-Konzentration abgeleitet werden kann. Die Konzentration an IgA-Paraprotein dient somit auch der

Beurteilung der Tumorlast. Im Falle der mit MOPC315.36-injizierten Mäuse konnte der Krankheitsverlauf anhand der veränderten Zellzahl pro Injektion und der anschließenden Wartezeit beeinflusst werden. Hieraus ergibt sich der Nachteil, dass der Erkrankungsfortschritt nicht anhand der Paraprotein-Konzentration bewertet werden kann. Die Diagnosekriterien der Hyperkalzämie, Anämie, Knochenläsionen sowie das Phänomen der extramedullären Hämatopoese können auch im fortgeschrittenen MOPC-Mausmodell abgebildet werden [111, 112, 151]. Da von einem gewissen Anteil der Mäuse nach Injektion von MOPC315.BM dennoch keine IgA-Paraprotein-Produktion ausging, ist es grundsätzlich ratsam, eine größere Anzahl an Versuchstieren in die Experimente einzuplanen. Eine unmittelbar nach Vorbereitung der Zellsuspension durchgeführte Injektion und eine routinierte Arbeitsweise erhöht die Wahrscheinlichkeit für eine Integration der Myelomzellen in das Knochenmark.

2. Aktivierung von neutrophilen Granulozyten durch IgA-Paraprotein

Der wichtigste IgA-Rezeptor $Fc\alpha RI$ findet sich auf der Oberfläche myeloischer Zellen [64, 73]. Hierzu zählen beispielsweise auch neutrophile Granulozyten, die unter anderem durch Freisetzung extrazellulärer Fallen (NETs) die Verbreitung von Pathogenen verhindern. Die von den Neutrophilen ausgehenden netzartigen Strukturen konnten über eine Dreifachfärbung nachgewiesen werden. Hierbei konnte sowohl eine Markierung von DNA als auch von antimikrobiell wirksamer Myeloperoxidase erzielt werden [159]. Die Freisetzung der NETs kann auf zwei unterschiedliche Wege erfolgen: Der erste Aktivierungsweg erfolgt innerhalb weniger Minuten, die Plasmamembran bleibt nach DNA-Freisetzung intakt. Der zweite Aktivierungsweg, der auch als NETose bezeichnet wird und mittels NETose-Assay erfasst werden sollte, beschreibt einen mehrstündigen Vorgang, bei dem es wiederum unter dem Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zur Freisetzung der netzartigen Strukturen kommt [159, 160].

Es zeigte sich, dass die NET-Freisetzung mithilfe von IgA-Paraprotein-haltigen Zellkulturüberständen (MOPC315.BM) gefördert werden konnte. Die Anzahl festgestellter NETs war hierbei vergleichbar mit der Positivkontrolle (1000 nM PMA). Im Vergleich hierzu wurden nach Inkubation mit MOPC315.36-Zellkulturüberständen (enthält kein Paraprotein)

kaum Anzeichen von NETose festgestellt. Auch in einer weiteren Publikation konnte NETose vermehrt nach Inkubation der Neutrophilen mit Human-IgA festgestellt werden. Den größten Effekt zeigten jedoch Immunkomplexe bestehend aus IgA und Virusbestandteilen, was nochmals die antivirale Wirkung der NETs unterstreicht [161]. Grundsätzlich ist jedoch zu bedenken, dass das murine Homolog des humanen Fc α R bisher noch nicht bestimmt wurde und der Effekt des Zellkulturüberstands auch unabhängig vom IgA-Paraprotein sein könnte [73, 161]. Möglicherweise erklärt dies auch, warum sich in unseren Versuchsreihen keine konzentrationsabhängige Aktivierung der Neutrophilen durch IgA-Paraprotein ergab und hierbei noch weitere, unbekannte Faktoren eine Rolle spielen. Hierfür spricht außerdem, dass teilweise selbst nach Inkubation der Neutrophilen mit dem Zellkulturüberstand von MOPC315.36 geringe Aktivierungstendenzen verzeichnet wurden.

Der Zusammenhang zwischen IgA und vermehrter Neutrophilenaktivierung konnte bereits in einigen entzündlichen Erkrankungen beschrieben werden. Im Falle der Immunglobulin A - Vaskulitis, welche auch als Purpura Schönlein-Henoch bekannt ist, wird eine vermehrte Neutrophilenmigration durch gegen Endothelzellen gerichtetes IgA1 für die Gefäßentzündung verantwortlich gemacht. Nach Bindung von IgA1 an Fc α R1 auf der Oberfläche von Neutrophilen kommt es zur Freisetzung des entzündungsfördernden Leukotriens B4, was die Zellen zum Ort der Entzündung mobilisiert. Die nachfolgende Gefäßschädigung kann auf den ROS-abhängigen Vorgang der NETose zurückgeführt werden [118, 162]. Auch im Rahmen der rheumatoiden Arthritis konnte ein krankheitsfördernder Zusammenhang zwischen vermehrter NETose und dem Einfluss von IgA-Komplexen hergestellt werden [163, 164].

Anhand der Ergebnisse und aktueller wissenschaftlicher Veröffentlichungen kann von einer vermehrten Neutrophilenaktivierung und einer darauffolgenden Freisetzung von NETs durch IgA-Paraprotein ausgegangen werden. Fraglich ist jedoch, über welchen Rezeptor die Effektorfunktion des IgA-Paraproteins im Mausmodell vermittelt wird.

3. Keine vermehrte Thrombusbildung unter dem Einfluss von IgA-Paraprotein

In den kombinierten Versuchsreihen aus dem vorgestellten MOPC-Modell und anschließendem DVT-Operationsverfahren konnte die Hypothese des prothrombotischen Effekts von IgA-Paraprotein nicht bestätigt werden: Die Ergebnisse lassen keinen Zusammenhang zwischen steigender IgA-Paraprotein-Konzentration und vermehrter Thrombusbildung erkennen. Entgegen den Erwartungen ergaben sich auch nach mehrmaliger Wiederholung der Versuchsreihen keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Thrombusgewichts und der Thromboseinzidenz zwischen Positiv- (BALB/c + MOPC315.BM) und Kontrollgruppe (BALB/c + MOPC315.36). Überraschenderweise konnte gar in beiden Gruppen in gleicher Weise eine Reduktion beider Thromboseparameter im Vergleich zur unbehandelten Gruppe festgestellt werden.

Grundsätzlich ist bereits die Diagnose eines Multiplen Myeloms mit einer Erhöhung des Thromboserisikos verbunden, jedoch konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt hierfür keine eindeutigen Einflussfaktoren verantwortlich gemacht werden [113, 114, 116, 165]. Diskutiert werden unter anderem prothrombotische Effekte des Paraproteins sowie Einflüsse, die auf die maligne Erkrankung an sich zurückgeführt werden können. Nach aktuellem Forschungsstand wird davon ausgegangen, dass abhängig von der produzierten Antikörperklasse ein unterschiedlich hohes Thromboserisiko besteht: Eine Studie kam zu dem Schluss, dass Patienten mit IgG/IgA-MGUS ein höheres Thromboserisiko aufweisen, wohingegen für MGUS-Patienten, die auf den IgM-Typen zurückzuführen sind, dies jedoch nicht gilt [85]. Anzumerken ist hierbei, dass die Auswertung der Studie keine eindeutigen Schlüsse zulässt, inwieweit eine Differenzierung des IgG- und des IgA-Typus erfolgte, zumal es sich bei MGUS um eine gutartige Vorstufe des Multiplen Myeloms handelt, die zur Produktion von monoklonalem Protein führt. Zudem stellt sich die Frage, ob sich diese Ergebnisse auch auf die maligne Myelomerkrankung des IgA-Typs übertragen lassen. Folglich ist es auch von Interesse, einen möglichen prothrombotischen Einfluss des IgG-Paraproteins zu untersuchen: Tatsächlich gibt es Hinweise dafür, dass IgG-Paraprotein mit Fibrinstrukturen interagiert und somit durch Hemmung der Fibrinolyse das Thromboserisiko erhöhen könnte [166]. Auch verminderte Konzentrationen an Protein S könnten zur Entstehung venöser Thrombosen beim IgG-Myelom beitragen [167]. Zudem könnte IgG-Paraprotein eine prothrombotische Rolle über FcγRIIA auf menschlichen Thrombozyten einnehmen: Nach Bindung von

Immunkomplexen bestehend aus IgG und angehefteten Antigenen kommt es zur Aktivierung der Blutplättchen, was eine Entzündungsreaktion, eine Fehlsteuerung der Gefäßfunktion und schließlich auch die Thrombusbildung fördern könnte [168, 169]. Ein weiterer Grund für die reduzierte Thrombusbildung im MOPC-Mausmodell könnte die verminderte Neutrophilenmigration zum Ort der Entzündung sein: Die Zelllinie MOPC315.BM führt zur Produktion des immunsuppressiv wirksamen Zytokins IL-10, was wiederum die Migration neutrophiler Granulozyten über den Komplementfaktor C5a inhibiert [170]. Ebenso ist bekannt, dass IL-10 Inflammationen der Venenwände reduzieren kann, möglicherweise durch Herabsetzung von P- und E-Selektin [171, 172]. Wie unsere Ergebnisse bestätigen, könnte es somit durch IgA-Paraprotein zwar grundsätzlich zu einer Aktivierung von Neutrophilen in vitro kommen, jedoch ist hier kein Effekt auf die Thrombusbildung nachweisbar, möglicherweise durch den Einfluss von IL-10. Interessant wäre es hierbei zu untersuchen, ob die erhöhte IL-10-Produktion ebenso von der Zelllinie MOPC315.36 ausgeht, um dessen hemmenden Einfluss auf die Thrombusbildung bestätigen zu können.

Das veränderte Gerinnungsverhalten des Blutes von Myelom-Patienten könnte grundsätzlich auch auf den Effekt des Paraproteins auf die Thrombozytenfunktion zurückzuführen sein. Ein möglicher Einfluss des IgG-Paraproteins über die Plättchenrezeptoren GPIb und GPVI wurde bereits beschrieben. Diskutiert wird eine Rezeptorblockade durch Paraprotein, was folglich zu den Blutungsproblemen bei Myelom-Patienten führen könnte [173, 174]. Es wurde jedoch auch eine IgA-vermittelte Plättchenaktivierung über $Fc\alpha RI$ auf menschlichen Thrombozyten nachgewiesen [175]. Entsprechend konnte hier nach Inkubation von isolierten Thrombozyten mit beiden Zellkulturüberständen der untersuchten Myelomzelllinien eine erhöhte ATP-Freisetzung in-vitro festgestellt werden. Das Ausmaß der Aggregation blieb jedoch weitgehend unbeeinflusst. Da sich zwischen den beiden Zellkulturüberständen keine signifikanten Unterschiede ergaben, ist hier nicht von einem Effekt des IgA-Paraproteins auf Thrombozyten auszugehen.

Da am Vorgang der Immunothrombose sowohl Antikörper, als auch Zellen der myeloischen Reihe beteiligt sind, könnten in weiteren Versuchen zusätzlich immunhistologische Färbungen helfen, um eine mögliche Verteilung des IgA-Paraproteins im Thrombusgewebe darzustellen. Dabei könnten Immunfluoreszenz-Färbungen der Thromben beider Gruppen (BALB/c + MOPC315.BM und BALB/c + MOPC315.36) angefertigt werden, die auf eine Kolokalisation von

IgA-Paraprotein und verschiedenen Zelltypen abzielen. So könnte abschließend untersucht werden, ob IgA-Paraprotein überhaupt im Thrombusgewebe vorliegt.

Die diskutierten Ursachen für die erhöhte Thromboseinzidenz von Myelom-Patienten sind vielfältig und könnten auch auf den Einfluss verschiedener Zytokine zurückgeführt werden, die bei Entzündungsreaktionen hochreguliert sind. Hierzu zählen vor allem IL-6, C-reaktives Protein und TNF- α [165, 176]. Als Wachstumsfaktor reguliert IL-6 die Vermehrung der Myelomzellen und fördert zudem die Osteoklastenaktivität [165]. Es sind jedoch auch prokoagulatorische Effekte von IL-6 bekannt: Neben einer vermehrten Fibrinbildung wird hierfür unter anderem eine erhöhte Produktion von Gewebefaktor auf Monozyten durch den Einfluss von IL-6 verantwortlich gemacht [165, 177]. Zusätzlich können bei Patienten mit Multiplem Myelom aus bisher noch nicht eindeutig geklärten Gründen erhöhte Konzentrationen an Gerinnungsfaktoren festgestellt werden. Hierzu zählen unter anderem vWF sowie der Gerinnungsfaktor VIII [165, 178, 179]. Eine vergleichende ELISA-Messung der Plasmaproben der drei Mausgruppen (BALB/c und BALB/c + MOPC315.BM und BALB/c + MOPC315.36) könnte Aufschluss geben, ob auch in diesem Mausmodell erhöhte Konzentrationen an Gerinnungsfaktoren zu finden sind.

Nicht zu vernachlässigen ist im Übrigen auch der prokoagulatorische Einfluss des zur Behandlung der Grunderkrankung angewandten Therapieregimes. Hochdosiertes Dexamethason ist in der Lage, die Konzentrationen an P-Selektin, vWF und Faktor VIII zu erhöhen [176]. Insbesondere in Kombination mit dem Immunmodulator Thalidomid, was ebenfalls zur Erhöhung der vWF- und Faktor VIII-Konzentrationen führen kann, werden deutlich erhöhte Thromboseinzidenzen verzeichnet [176, 179]. Infolge des proapoptischen Effekts des Anthrazyklins Doxorubicin auf Myelom- und Endothelzellen wird eine Freisetzung prokoagulatorischer Faktoren vermutet, was wiederum einen Einfluss auf die Thrombosegefahr nehmen könnte [165, 180].

4. Fazit

Abschließend soll beurteilt werden, ob die eingangs aufgestellten Hypothesen im Rahmen dieses Projektes bestätigt oder widerlegt werden können.

Die erste Zielvorgabe beruhte zunächst auf einer Etablierung und Charakterisierung des MOPC-Mausmodells. Die injizierten Myelomzellen setzen sich primär im Knochenmark der Versuchstiere fest und konnten sich dort vermehren. Ein Befall der Knochenstrukturen mit malignen Myelomzellen wurde in den betroffenen Versuchstieren durch histologische Aufarbeitung von Knochengewebe bestätigt. Ebenfalls konnte ein Zusammenhang zwischen der gemessenen IgA-Paraprotein-Konzentration und einem Fortschreiten der Erkrankung hergestellt werden. Tiere mit besonders hohen Werten an IgA-Paraprotein wiesen auffällige Blutbildveränderungen auf, die insbesondere in einem späteren Erkrankungsstadium auftraten. Anzeichen von Neoplasie konnten in den Geweben der Milz sowie der Knochen festgestellt werden. Der Vorgang der extramedullären Hämatopoese äußerte sich nach Injektion der Myelomzellen in einem vermehrten Wachstum der Milz.

Zuletzt wurde überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen steigender IgA-Paraprotein-Konzentration und vermehrter Thrombusbildung hergestellt werden kann. Weder das Thrombusgewicht noch die Thromboseinzidenz konnten mit veränderter IgA-Paraprotein-Konzentration gesteigert werden, wodurch ein Zusammenhang dieser Parameter nicht bestätigt werden konnte. Auch ein Einfluss des IgA-Paraproteins auf die Thrombuszusammensetzung konnte nicht eindeutig belegt werden. Es konnte keine veränderte Verteilung von Neutrophilen und Thrombozyten durch den Einfluss von IgA-Paraprotein im Thrombus festgestellt werden. Eine Reduktion der Monozytenzahlen wurde in den Thromben beider Gruppen (BALB/c + MOPC315.BM und BALB/c + MOPC315.36) vorgefunden.

Mögliche modellspezifische Herausforderungen und offene Fragen sollten in Zukunft noch geklärt werden: Möglicherweise war die IgA-Paraprotein-Konzentration trotz fortgeschrittenem Erkrankungsstadium der Mäuse nicht ausreichend hoch, um einen prothrombotischen Effekt zu bewirken. Des Weiteren muss bedacht werden, dass das Verteilungsmuster von Fc α RI auf humanen Effektorzellen nur eingeschränkt auf das Mausmodell übertragen werden kann.

VI. Zusammenfassung

Das hohe Aufkommen venöser Thrombosen stellt bei Patienten mit Multiplen Myelom ein bedeutendes Risiko dar und geht mit einer erhöhten Sterblichkeit einher. Die zugrundeliegenden pathologischen Vorgänge der Thrombusentstehung sind bis heute jedoch weitgehend unbekannt. Die vorliegende Arbeit hat daher das Ziel, die Mechanismen der Thrombose beim Multiplen Myelom zu untersuchen.

Mithilfe eines IgA-Paraprotein-produzierenden Tiermodells konnte in BALB/c-Mäusen ein Zustand abgebildet werden, der einige Gemeinsamkeiten mit der humanen Myelom-Erkrankung aufweist: Die zuvor injizierten Myelomzellen (MOPC315.BM und MOPC315.36) wurden sowohl in der Milz als auch in den Knochenstrukturen des Femurs und der Wirbelsäule nachgewiesen. Die IgA-Paraprotein-Konzentration erwies sich als zuverlässiger Parameter zur Beurteilung des Erkrankungsfortschritts und damit der Tumorlast. Der Vorgang der extramedullären Hämatopoese manifestierte sich in einem auffälligen Wachstum der Milz, gepaart mit hohen Werten an IgA-Paraprotein in der Positivgruppe (BALB/c + MOPC315.BM). Im Blut der betroffenen Tiere konnten Anzeichen von Anämie sowie abnorme Lymphozyten- und Monozytenzahlen festgestellt werden. Im Rahmen von in-vitro-Experimenten konnte eine erhöhte Aktivierung von neutrophilen Granulozyten durch IgA-Paraprotein-haltige Zellkulturüberstände nachgewiesen werden, was sich durch vermehrte Ausbildung extrazellulärer Fallen (NETs) zeigte. Um den potentiell prothrombotischen Einfluss des monoklonalen Proteins zu untersuchen, wurden IgA-Paraprotein-sezernierende BALB/c-Mäuse (injiziert mit MOPC315.BM) und nicht-sezernierende BALB/c-Mäusen (injiziert mit MOPC315.36) nach Stenosierung der Vena cava inferior auf die Entstehung venöser Thromben überprüft. Da sich zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Thromboseinzidenz und des Thrombusgewichts ergaben, konnte in diesem Modell kein prothrombotischer Einfluss von IgA-Paraprotein nachgewiesen werden.

Auch in Zukunft wird sich die medizinische Forschung somit mit der Frage beschäftigen müssen, welche Mechanismen der Thrombose beim Multiplen Myelom zugrunde liegen. Ziel sollte es hierbei sein, einen Ansatz zur Thrombosebehandlung unter Umgehung einer

überschießenden Gerinnungshemmung zu entwickeln und gleichzeitig eine Verschlechterung der Grunderkrankung zu vermeiden.

VII. Summary

The high incidence of venous thrombosis in patients with multiple myeloma is associated with high risk and increased mortality. The underlying mechanisms that facilitate the increased incidence in thrombosis in myeloma patients have not yet been fully understood. Therefore, this thesis aims to investigate the mechanisms of thrombosis in multiple myeloma.

By employing an IgA paraprotein-producing multiple myeloma-mouse model we were able to describe a malignant condition resembling human myeloma in BALB/c mice: The injected myeloma cells (MOPC315.BM and MOPC315.36) were detected both in spleen and in bone structures of femur and spine. The IgA paraprotein concentration proved to be a reliable parameter for disease progression and tumor load in mice. Massive splenomegaly accompanied with high levels of IgA paraprotein was observed as a result of extramedullary hematopoiesis. Signs of anemia as well as abnormal lymphocyte and monocyte counts were detected in the blood of affected mice. Activation of neutrophils after incubation with IgA paraprotein-containing supernatant was shown by increased NET-formation (neutrophil extracellular traps). In order to investigate its potential prothrombotic effect, IgA paraprotein-secreting BALB/c mice (injected with MOPC315.BM) and non-secreting BALB/c mice (injected with MOPC315.36) were both studied in a vena cava stenosis model. Despite the mouse model has successfully been established, the mice in both groups showed to have no significant difference regarding incidence of thrombosis and thrombus weight. Therefore, in our model IgA paraprotein alone was not effective to increase thrombus formation.

In summary, the underlying mechanisms of increased venous thrombosis in multiple myeloma still need to be further investigated. The aim is to develop an approach for the treatment of thrombosis by circumventing excessive inhibition of the coagulation system. In any case, deterioration of the underlying disease should be avoided during thrombosis treatment.

VIII. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Schema der Gerinnungskaskade modifiziert nach [20]</i>	11
<i>Abbildung 2: Schema der Komplementkaskade modifiziert nach [2]</i>	18
<i>Abbildung 3: Schema eines monomeren Antikörpers modifiziert nach [1]</i>	21
<i>Abbildung 4: Gemessene IgA-Paraprotein-Konzentration in Abhängigkeit von der injizierten Zellmenge und der Wartezeit</i>	70
<i>Abbildung 5: Gemessene IgA-Paraprotein-Konzentration und der Einfluss auf das Diagnosekriterium der Anämie</i>	72
<i>Abbildung 6: Gewichtsveränderung in Abhängigkeit zur IgA-Paraprotein-Konzentration (n = 54)</i>	74
<i>Abbildung 7: Veränderung der Erythrozytenzahl, der Hämatokrit- und Hämoglobin-Werte..</i>	75
<i>Abbildung 8: Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Femurs (400-fache Vergrößerung, Schnittdicke 4 µm)</i>	77
<i>Abbildung 9: Gewicht und Größe der Milz in Abhängigkeit zur IgA-Paraprotein-Konzentration (n = 35)</i>	79
<i>Abbildung 10: Hämatoxylin-Eosin-Färbung einer Milz (400-fache Vergrößerung, Schnittdicke 4 µm)</i>	79
<i>Abbildung 11: Veränderung des Milzgewichts und der Milzgröße nach MOPC315.36-Injektion</i>	80
<i>Abbildung 12: Lymphozyten- ($10^3/\mu\text{l}$) und Monozytenzahl ($10^3/\mu\text{l}$) in Abhängigkeit zur IgA-Paraprotein-Konzentration (n = 54)</i>	81
<i>Abbildung 13: Einfluss von IgA-Paraprotein auf Neutrophile</i>	83
<i>Abbildung 14: vermehrte NET-Bildung nach Einfluss von IgA-Paraprotein auf Neutrophile ...</i>	84
<i>Abbildung 15: Einfluss von IgA-Paraprotein auf Thrombozyten</i>	85
<i>Abbildung 16: Einfluss von IgA-Paraprotein auf die Thrombuskomposition</i>	89
<i>Abbildung 17: Auswirkung von IgA-Paraprotein auf das Thrombusgewicht und auf die Thromboseinzidenz</i>	91

IX. Literaturverzeichnis

1. Mix, E., R. Goertsches, and U.K. Zett, *Immunoglobulins—Basic considerations*. Journal of Neurology, 2006. **253**(S5): p. v9-v17.
2. Kolev, M., G.L. Friec, and C. Kemper, *Complement — tapping into new sites and effector systems*. Nature Reviews Immunology, 2014. **14**(12): p. 811-820.
3. Goldschmidt, H., et al., *Multiples Myelom*. Der Onkologe, 2003. **9**(10): p. 1152-1168.
4. Durie, B.G.M., *Patient Handbook Multiple Myeloma (Cancer of the Bone Marrow)*. International Myeloma Foundation. 2022.
5. Goldschmidt, H., *Multiples Myelom*, in *Die Onkologie*. 2010, Springer Berlin Heidelberg. p. 1590-1607.
6. Kristinsson, S.Y., *Thrombosis in Multiple Myeloma*. Hematology, 2010. **2010**(1): p. 437-444.
7. Kristinsson, S.Y., et al., *Deep vein thrombosis after monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma*. Blood, 2008. **112**(9): p. 3582-3586.
8. Kristinsson, S.Y., et al., *Thrombosis is associated with inferior survival in multiple myeloma*. Haematologica, 2012. **97**(10): p. 1603-7.
9. Prandoni, P., et al., *Recurrent venous thromboembolism and bleeding complications during anticoagulant treatment in patients with cancer and venous thrombosis*. Blood, 2002. **100**(10): p. 3484-3488.
10. Busse, J., *Antikörper als neue Faktoren im immunologischen Prozess der venösen Thrombose*. 2015, lmu.
11. Heineke, M.H., et al., *New insights in the pathogenesis of immunoglobulin A vasculitis (Henoch-Schönlein purpura)*. Autoimmunity Reviews, 2017. **16**(12): p. 1246-1253.
12. Endo, M., *Glomerular deposition of mannose-binding lectin (MBL) indicates a novel mechanism of complement activation in IgA nephropathy*. Nephrology Dialysis Transplantation, 1998. **13**(8): p. 1984-1990.
13. Hiemstra, P.S., et al., *Activation of the alternative pathway of complement by human serum IgA*. Eur J Immunol, 1987. **17**(3): p. 321-6.
14. Maillard, N., et al., *Current Understanding of the Role of Complement in IgA Nephropathy*. Journal of the American Society of Nephrology, 2015. **26**(7): p. 1503-1512.
15. Roos, A., et al., *Human IgA Activates the Complement System Via the Mannan-Binding Lectin Pathway*. The Journal of Immunology, 2001. **167**(5): p. 2861-2868.
16. Goldhaber, S.Z., *Venous thromboembolism: Epidemiology and magnitude of the problem*. Best Practice & Research Clinical Haematology, 2012. **25**(3): p. 235-242.
17. *Definition - Startseite Risiko Thrombose*. [cited 2022 09.08.2022]; Available from: <https://www.risiko-thrombose.de/definition.html>.
18. Vaupel, P., et al., *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. 2015.
19. Gale, A.J., *Continuing Education Course #2: Current Understanding of Hemostasis*. Toxicologic Pathology, 2011. **39**(1): p. 273-280.
20. Boon, G.D., *An Overview of Hemostasis*. Toxicologic Pathology, 1993. **21**(2): p. 170-179.
21. Linnemann, B. and E. Lindhoff-Last, *Virchow-Trias*, in *Prävention von Thrombosen und Embolien in der Inneren Medizin*. 2005, Springer. p. 40-44.
22. López, J.A., C. Kearon, and A.Y.Y. Lee, *Deep Venous Thrombosis*. Hematology, 2004. **2004**(1): p. 439-456.
23. Chernysh, I.N., et al., *The distinctive structure and composition of arterial and venous thrombi and pulmonary emboli*. Scientific Reports, 2020. **10**(1).
24. Sevitt, S., *The structure and growth of valve-pocket thrombi in femoral veins*. Journal of Clinical Pathology, 1974. **27**(7): p. 517-528.
25. Schulz, C., B. Engelmann, and S. Massberg, *Crossroads of coagulation and innate immunity: the case of deep vein thrombosis*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2013. **11**: p. 233-241.

26. Rosendaal, F., *Venous thrombosis: a multicausal disease*. The Lancet, 1999. **353**(9159): p. 1167-1173.
27. Nikol, S. and K. Middendorf, *Thromboembolie- und Arterioskleroserisiko bei Frauen*. Zeitschrift für Kardiologie, 2002. **91**(7): p. 523-535.
28. Wessler, S., *Estrogen-associated thromboembolism*. Annals of Epidemiology, 1992. **2**(4): p. 439-443.
29. Stark, K. and S. Massberg, *Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology*. Nature Reviews Cardiology, 2021. **18**(9): p. 666-682.
30. Engelmann, B. and S. Massberg, *Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity*. Nature Reviews Immunology, 2013. **13**(1): p. 34-45.
31. Etulain, J., et al., *P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice*. Blood, 2015. **126**(2): p. 242-246.
32. Stark, K., et al., *Disulfide HMGB1 derived from platelets coordinates venous thrombosis in mice*. Blood, 2016. **128**(20): p. 2435-2449.
33. Castanheira, F.V.S. and P. Kubes, *Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation*. Blood, 2019. **133**(20): p. 2178-2185.
34. Lee, K.H., et al., *Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review*. Autoimmun Rev, 2017. **16**(11): p. 1160-1173.
35. Greaves, M., *Antiphospholipid antibodies and thrombosis*. Lancet, 1999. **353**(9161): p. 1348-53.
36. Carhuapoma, J.R., P. Mitsias, and S.R. Levine, *Cerebral venous thrombosis and anticardiolipin antibodies*. Stroke, 1997. **28**(12): p. 2363-9.
37. Tektonidou, M.G., et al., *Risk factors for thrombosis and primary thrombosis prevention in patients with systemic lupus erythematosus with or without antiphospholipid antibodies*. Arthritis Care & Research, 2008. **61**(1): p. 29-36.
38. Harris, E.N., et al., *Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus*. Lancet, 1983. **2**(8361): p. 1211-4.
39. Farmer-Boatwright, M.K. and R.A.S. Roubey, *Venous Thrombosis in the Antiphospholipid Syndrome*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2009. **29**(3): p. 321-325.
40. Menis, M., et al., *Hyperimmune globulins and same-day thrombotic adverse events as recorded in a large healthcare database during 2008–2011*. American Journal of Hematology, 2013. **88**(12): p. 1035-1040.
41. Daniel, G.W., et al., *Immune globulins and thrombotic adverse events as recorded in a large administrative database in 2008 through 2010*. Transfusion, 2012. **52**(10): p. 2113-2121.
42. Ammann, E.M., et al., *Intravenous immune globulin and thromboembolic adverse events in patients with hematologic malignancy*. Blood, 2016. **127**(2): p. 200-207.
43. Langer, F., et al., *Rapid activation of monocyte tissue factor by antithymocyte globulin is dependent on complement and protein disulfide isomerase*. Blood, 2013. **121**(12): p. 2324-2335.
44. Schmidt, C.Q. and A. Verschoor, *Complement and coagulation: so close, yet so far*. Blood, 2017. **130**(24): p. 2581-2582.
45. Langer, H.F. and A. Verschoor, *Crosstalk between platelets and the complement system in immune protection and disease*. Thrombosis and Haemostasis, 2013. **110**(11): p. 910-919.
46. Koupenova, M., et al., *The role of platelets in mediating a response to human influenza infection*. Nature Communications, 2019. **10**(1).
47. Luo, S., et al., *Complement in Hemolysis- and Thrombosis- Related Diseases*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 1212.
48. Amara, U., et al., *Interaction Between the Coagulation and Complement System*, in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2008, Springer US. p. 68-76.
49. Nicolai, L., et al., *Immunothrombotic Dysregulation in COVID-19 Pneumonia Is Associated With Respiratory Failure and Coagulopathy*. Circulation, 2020. **142**(12): p. 1176-1189.
50. Bonaventura, A., et al., *Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19*. Nature Reviews Immunology, 2021. **21**(5): p. 319-329.

51. Chaplin, D.D., *Overview of the immune response*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2010. **125**(2): p. S3-S23.
52. Mastellos, D.C., D. Ricklin, and J.D. Lambris, *Clinical promise of next-generation complement therapeutics*. Nature Reviews Drug Discovery, 2019. **18**(9): p. 707-729.
53. Arango Duque, G. and A. Descoteaux, *Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 491.
54. Müller-Esterl, W., *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler-Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kerscher, Stefan Kieß und Katrin Ridinger*. 2017: Springer-Verlag.
55. Sarma, J.V. and P.A. Ward, *The complement system*. Cell and Tissue Research, 2011. **343**(1): p. 227-235.
56. Dunkelberger, J.R. and W.-C. Song, *Complement and its role in innate and adaptive immune responses*. Cell Research, 2010. **20**(1): p. 34-50.
57. Shapiro-Shelef, M. and K. Calame, *Regulation of plasma-cell development*. Nature Reviews Immunology, 2005. **5**(3): p. 230-242.
58. Murphy, K. and C. Weaver, *Die Entwicklung der B- und T-Lymphocyten*, in *Janeway Immunologie*. 2018, Springer Berlin Heidelberg. p. 377-440.
59. Nutt, S.L., et al., *The generation of antibody-secreting plasma cells*. Nature Reviews Immunology, 2015. **15**(3): p. 160-171.
60. Calame, K.L., *Plasma cells: finding new light at the end of B cell development*. Nature Immunology, 2001. **2**(12): p. 1103-1108.
61. Pieper, K., B. Grimbacher, and H. Eibel, *B-cell biology and development*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2013. **131**(4): p. 959-971.
62. Baumgarth, N., *The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions*. Nature Reviews Immunology, 2011. **11**(1): p. 34-46.
63. Shlomchik, M.J. and F. Weisel, *Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells*. Immunological Reviews, 2012. **247**(1): p. 52-63.
64. Schroeder, H.W. and L. Cavacini, *Structure and function of immunoglobulins*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2010. **125**(2): p. S41-S52.
65. Späth, P.J., *Structure and function of immunoglobulins*. Sepsis, 1999. **3**(3): p. 197-218.
66. Forthal, D.N., *Functions of Antibodies*. Microbiol Spectr, 2014. **2**(4): p. AID-0019-2014.
67. Childers, N.K., M.G. Bruce, and J.R. Mcghee, *MOLECULAR MECHANISMS OF IMMUNOGLOBULIN A DEFENSE*. Annual Review of Microbiology, 1989. **43**(1): p. 503-536.
68. Cerutti, A. and M. Rescigno, *The Biology of Intestinal Immunoglobulin A Responses*. Immunity, 2008. **28**(6): p. 740-750.
69. Woof, J.M. and M.A. Kerr, *The function of immunoglobulin A in immunity*. The Journal of Pathology, 2006. **208**(2): p. 270-282.
70. Murphy, K. and C. Weaver, *Das mucosale Immunsystem*, in *Janeway Immunologie*. 2018, Springer Berlin Heidelberg. p. 641-691.
71. Kuhbandner, K., et al., *MAdCAM-1-Mediated Intestinal Lymphocyte Homing Is Critical for the Development of Active Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 903.
72. Underdown, B.J. and J.M. Schiff, *Immunoglobulin A: Strategic Defense Initiative at the Mucosal Surface*. Annual Review of Immunology, 1986. **4**(1): p. 389-417.
73. Van Egmond, M., et al., *IgA and the IgA Fc receptor*. Trends in Immunology, 2001. **22**(4): p. 205-211.
74. Bakema, J.E. and M. Van Egmond, *Immunoglobulin A. mAbs*, 2011. **3**(4): p. 352-361.
75. Monteiro, R.C. and J.G. Van De Winkel, *IgA Fc receptors*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 177-204.
76. Hostoffer, R.W., I. Krukovets, and M. Berger, *Enhancement by Tumor Necrosis Factor- of Fc Receptor Expression and IgA-Mediated Superoxide Generation and Killing of Pseudomonas aeruginosa by Polymorphonuclear Leukocytes*. Journal of Infectious Diseases, 1994. **170**(1): p. 82-87.

77. Shibuya, A. and S.-I. Honda, *Molecular and functional characteristics of the Fc α / μ R, a novel Fc receptor for IgM and IgA*. Springer Seminars in Immunopathology, 2006. **28**(4): p. 377-382.
78. Shibuya, A., S.-I. Honda, and K. Shibuya, *A pro-inflammatory role of Fc α / μ R on marginal zone B cells in sepsis*. International Immunology, 2017. **29**(11): p. 519-524.
79. Moura, I.C., et al., *Identification of the Transferrin Receptor as a Novel Immunoglobulin (Ig)a1 Receptor and Its Enhanced Expression on Mesangial Cells in Iga Nephropathy*. Journal of Experimental Medicine, 2001. **194**(4): p. 417-426.
80. Yel, L., *Selective IgA Deficiency*. Journal of Clinical Immunology, 2010. **30**(1): p. 10-16.
81. Perše, M. and Ž. Večerić-Haler, *The Role of IgA in the Pathogenesis of IgA Nephropathy*. International Journal of Molecular Sciences, 2019. **20**(24): p. 6199.
82. Green, P.H.R. and C. Cellier, *Celiac Disease*. New England Journal of Medicine, 2007. **357**(17): p. 1731-1743.
83. Tosco, A., et al., *Intestinal titres of anti-tissue transglutaminase 2 antibodies correlate positively with mucosal damage degree and inversely with gluten-free diet duration in coeliac disease*. Clinical and Experimental Immunology, 2014. **177**(3): p. 611-617.
84. Chauhan, A., et al., *Pan-Gastrointestinal Tract Mucosal Pathologies in Patients with Celiac Disease with the Demonstration of IgA Anti-Transglutaminase Mucosal Deposits: A Case–Control Study*. Digestive Diseases and Sciences, 2021.
85. Kristinsson, S.Y., et al., *Arterial and venous thrombosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma: a population-based study*. Blood, 2010. **115**(24): p. 4991-8.
86. Teng, H.-W., et al., *The Prolonged Activated Partial Thromboplastin Time at Diagnosis Indicates Less Favorable Prognosis in IgA Myeloma*. Japanese Journal of Clinical Oncology, 2007. **37**(8): p. 609-614.
87. Morris, T., et al., *Effects of low-dose aspirin on acute inflammatory responses in humans*. J Immunol, 2009. **183**(3): p. 2089-96.
88. Von Brühl, M.-L., et al., *Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo*. Journal of Experimental Medicine, 2012. **209**(4): p. 819-835.
89. Ridker, P.M., et al., *Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease*. New England Journal of Medicine, 2017. **377**(12): p. 1119-1131.
90. Tardif, J.-C., et al., *Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction*. New England Journal of Medicine, 2019. **381**(26): p. 2497-2505.
91. Vogel, S., et al., *Platelet-derived HMGB1 is a critical mediator of thrombosis*. Journal of Clinical Investigation, 2015. **125**(12): p. 4638-4654.
92. Seidl, S., H. Kaufmann, and J. Drach, *New insights into the pathophysiology of multiple myeloma*. The Lancet Oncology, 2003. **4**(9): p. 557-564.
93. Lentzsch, S., L.A. Ehrlich, and G.D. Roodman, *Pathophysiology of Multiple Myeloma Bone Disease*. Hematology/Oncology Clinics of North America, 2007. **21**(6): p. 1035-1049.
94. Mahindra, A., T. Hideshima, and K.C. Anderson, *Multiple myeloma: biology of the disease*. Blood Reviews, 2010. **24**: p. S5-S11.
95. Rajkumar, S.V. and S. Kumar, *Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment*. Mayo Clinic Proceedings, 2016. **91**(1): p. 101-119.
96. Kazandjian, D., *Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy*. Seminars in Oncology, 2016. **43**(6): p. 676-681.
97. Collins, C.D., *Problems monitoring response in multiple myeloma*. Cancer Imaging, 2005. **5 Spec No A**: p. S119-26.
98. Gerecke, C., et al., *The Diagnosis and Treatment of Multiple Myeloma*. Deutsches Ärzteblatt international, 2016.
99. Alexander, D.D., et al., *Multiple myeloma: A review of the epidemiologic literature*. International Journal of Cancer, 2007. **120**(S12): p. 40-61.
100. Koura, D.T. and A.A. Langston, *Inherited predisposition to multiple myeloma*. Therapeutic Advances in Hematology, 2013. **4**(4): p. 291-297.

101. Zheng, C., et al., *Interleukin-10 gene promoter polymorphisms in multiple myeloma*. International Journal of cancer, 2001. **95**(3): p. 184-188.
102. Sekiguchi, Y., et al., *Epstein-Barr virus-positive multiple myeloma developing after immunosuppressant therapy for rheumatoid arthritis: a case report and review of literature*. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2015. **8**(2): p. 2090.
103. Rajkumar, S.V., et al., *International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma*. The Lancet Oncology, 2014. **15**(12): p. e538-e548.
104. *Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group*. British Journal of Haematology, 2003. **121**(5): p. 749-757.
105. Dupuis, M.M. and S.A. Tuchman, *Non-secretory multiple myeloma: from biology to clinical management*. OncoTargets and Therapy, 2016. **Volume 9**: p. 7583-7590.
106. Maniatis, A., *Pathophysiology of paraprotein production*. Renal Failure, 1998. **20**(6): p. 821-828.
107. Gamez, B. and C.M. Edwards, *Contributions of the Bone Microenvironment to Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance Pathogenesis*. Curr Osteoporos Rep, 2018. **16**(6): p. 635-641.
108. Rajkumar, S.V., et al., *Current Therapy for Multiple Myeloma*. Mayo Clinic Proceedings, 2002. **77**(8): p. 813-822.
109. De Weers, M., et al., *Daratumumab, a Novel Therapeutic Human CD38 Monoclonal Antibody, Induces Killing of Multiple Myeloma and Other Hematological Tumors*. The Journal of Immunology, 2011. **186**(3): p. 1840-1848.
110. Touzeau, C., P. Moreau, and C. Dumontet, *Monoclonal antibody therapy in multiple myeloma*. Leukemia, 2017. **31**(5): p. 1039-1047.
111. Hofgaard, P.O., et al., *A Novel Mouse Model for Multiple Myeloma (MOPC315.BM) That Allows Noninvasive Spatiotemporal Detection of Osteolytic Disease*. PLoS ONE, 2012. **7**(12): p. e51892.
112. Riedel, S.S., et al., *Non-invasive imaging provides spatiotemporal information on disease progression and response to therapy in a murine model of multiple myeloma*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e52398.
113. Fotiou, D., M. Gavriatopoulou, and E. Terpos, *Multiple Myeloma and Thrombosis: Prophylaxis and Risk Prediction Tools*. Cancers (Basel), 2020. **12**(1).
114. Cesarman-Maus, G., E. Braggio, and R. Fonseca, *Thrombosis in multiple myeloma (MM)*. Hematology, 2012. **17 Suppl 1**: p. S177-80.
115. Palumbo, A. and C. Palladino, *Venous and arterial thrombotic risks with thalidomide: evidence and practical guidance*. Therapeutic Advances in Drug Safety, 2012. **3**(5): p. 255-266.
116. Zangari, M., et al., *Thrombosis in multiple myeloma*. Expert Review of Anticancer Therapy, 2007. **7**(3): p. 307-315.
117. Eby, C.S., *Bleeding and Thrombosis Risks in Plasma Cell Dyscrasias*. Hematology, 2007. **2007**(1): p. 158-164.
118. Heineke, M.H., et al., *New insights in the pathogenesis of immunoglobulin A vasculitis (Henoch-Schonlein purpura)*. Autoimmun Rev, 2017. **16**(12): p. 1246-1253.
119. Audemard-Verger, A., et al., *IgA vasculitis (Henoch–Shönlein purpura) in adults: Diagnostic and therapeutic aspects*. Autoimmunity reviews, 2015. **14**(7): p. 579-585.
120. Allez, M., et al., *COVID-19–Related IgA Vasculitis*. Arthritis & Rheumatology, 2020. **72**(11): p. 1952-1953.
121. Pillebout, E. and C. Sunderkötter, *IgA vasculitis*. Seminars in Immunopathology, 2021. **43**(5): p. 729-738.
122. *BALB/cAnNRj Mouse - Janvier Labs*. 2022 [cited 2022 20.05.2022]; Available from: https://janvier-labs.com/en/fiche_produit/balb-cannrj_mouse/.
123. *000651 - BALBc Strain Details*. 2022 [cited 2022 20.05.2022]; Available from: <https://www.jax.org/strain/000651>.

124. Takakura, K., W.B. Mason, and V.P. Hollander, *Studies on the Pathogenesis of Plasma Cell Tumors: I. Effect of Cortisol on Development of Plasma Cell Tumors*. Cancer Research, 1966. **26**(4_Part_1): p. 596-599.
125. Corthay, A., K.B. Lorvik, and B. Bogen, *Is Secretion of Tumour-specific Antigen Important for Cancer Eradication by CD4+ T Cells? - Implications for Cancer Immunotherapy by Adoptive T Cell Transfer*. Scandinavian Journal of Immunology, 2011. **73**(6): p. 527-530.
126. Hawkey, T.F., M. Preston, and C.V. Maani, *Isoflurane*, in *StatPearls*. 2022: Treasure Island (FL).
127. Ehrlich, A.C., *Untersuchung der funktionellen Eigenschaften der retikulierten Thrombozyten im Kontext der arteriellen Thrombose in vivo*. 2020, lmu.
128. *Buprenovet sine 0,3 mg/ml Injektionslösung für Hunde und Katzen*. 2022 [cited 2022 20.05.2022]; Available from: <https://medikamio.com/de-de/medikamente/buprenovet-sine-03-mgml-injektionslosung-fur-hunde-und-katzen/pil>.
129. Baier, M., *Die Rolle der Ca²⁺/Calmodulin abhängigen Proteinkinase II in der akuten Phase der Nachlastserhöhung im Herzen*. 2020.
130. Chandraratne, S., *Rolle der Neutrophil Extracellular Traps (NETs) bei der Entstehung der venösen Thrombose*. 2012, lmu.
131. Dominik, A., D. Steinhilber, and M. Wurglics, *Instrumentelle analytik kompakt*. 2013: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart.
132. *Jabłoński-Schema – Wikipedia*. 2022 [cited 2022 20.05.2022]; Available from: <https://de.wikipedia.org/wiki/Jab%C5%82o%C5%84ski-Schema>.
133. *Fluoreszenzmikroskopie – Wikipedia*. 2022 [cited 2022 20.05.2022]; Available from: https://de.wikipedia.org/wiki/Fluoreszenzmikroskopie#Das_Epifluoreszenzmikroskop:_das_typische_Fluoreszenzmikroskop.
134. *Konfokalmikroskop – Wikipedia*. 2022 [cited 2022 20.05.2022]; Available from: <https://de.wikipedia.org/wiki/Konfokalmikroskop>.
135. *Konfokalmikroskop | Sonstige Mikroskope | Glossar zur Mikroskopie | KEYENCE Deutschland*. 2022 [cited 2022 20.05.2022]; Available from: https://www.keyence.de/ss/products/microscope/microscope_glossary/other_microscopes/confocal_microscope.jsp.
136. Phelan, M.C. and G. Lawler, *Cell counting*. Current protocols in cytometry, 1997(1): p. A. 3A. 1-A. 3A. 4.
137. Farah, M.E., et al., *Current Concepts of Trypan Blue in Chromovitrectomy*, in *Vital Dyes in Vitreoretinal Surgery*. 2008, KARGER. p. 91-100.
138. *Sandwich ELISA with Streptavidin-biotin Detection - Creative Biolabs*. 2022 [cited 2022 20.05.2022]; Available from: <https://www.antibody-creativebiolabs.com/sandwich-elisa-with-streptavidin-biotin-detection.htm>.
139. *Avidin-Biotin Interaction - DE*. 2022 [cited 2022 20.05.2022]; Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/avidin-biotin-interaction.html>.
140. Mayadas, T.N., X. Cullere, and C.A. Lowell, *The Multifaceted Functions of Neutrophils*. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2014. **9**(1): p. 181-218.
141. Yipp, B.G. and P. Kubes, *NETosis: how vital is it?* Blood, 2013. **122**(16): p. 2784-2794.
142. *Neutrophil extracellular traps - Wikipedia*. 2022 [cited 2022 20.05.2022]; Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Neutrophil_extracellular_traps.
143. Jorch, S.K. and P. Kubes, *An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease*. Nature Medicine, 2017. **23**(3): p. 279-287.
144. *Lichttransmissionsaggregometrie – Wikipedia*. 2022 [cited 2022 20.05.2022]; Available from: <https://de.wikipedia.org/wiki/Lichttransmissionsaggregometrie>.
145. Stockhausen, S., *Die Antikörper-Thrombozyteninteraktion als zentraler Mechanismus in der Entstehung der venösen Thrombose*. 2019, lmu.
146. Koltai, K., et al., *Platelet Aggregometry Testing: Molecular Mechanisms, Techniques and Clinical Implications*. International Journal of Molecular Sciences, 2017. **18**(8): p. 1803.

147. Calatzis, A., et al., *Multiple electrode aggregometry: A new device to measure platelet aggregation in whole blood*. *Thrombosis and Haemostasis*, 2006. **96**(12): p. 781-788.
148. Rwibasira Rudinga, G., G. Khan, and Y. Kong, *Protease-Activated Receptor 4 (PAR4): A Promising Target for Antiplatelet Therapy*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018. **19**(2): p. 573.
149. Han, X. and M.T. Nieman, *PAR4 (Protease-Activated Receptor 4)*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2018. **38**(2): p. 287-289.
150. Kim, C., *Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis*. *Journal of Blood Medicine*, 2010: p. 13.
151. Bhutani, M., et al., *Extramedullary multiple myeloma*. *Leukemia*, 2020. **34**(1): p. 1-20.
152. Kriz, J., et al., *Radiotherapy of splenomegaly*. *Strahlentherapie und Onkologie*, 2011. **187**(4): p. 221-224.
153. Jacobs, P., L. Wood, and P. Close, *Myeloma Presenting with Massive Splenomegaly*. *Hematology*, 1998. **3**(5): p. 375-379.
154. Edwards, C.V., et al., *Monocytosis at Diagnosis Is Associated with Decreased Overall Survival in Patients with Newly Diagnosed Multiple Myeloma*. *Blood*, 2020. **136**: p. 8-9.
155. Shin, S.-J., et al., *Prognostic Significance of Absolute Lymphocyte Count/Absolute Monocyte Count Ratio at Diagnosis in Patients with Multiple Myeloma*. *Korean Journal of Pathology*, 2013. **47**(6): p. 526.
156. Suyani, E., et al., *Tumor-associated macrophages as a prognostic parameter in multiple myeloma*. *Annals of Hematology*, 2013. **92**(5): p. 669-677.
157. Berardi, S., et al., *Multiple Myeloma Macrophages: Pivotal Players in the Tumor Microenvironment*. *Journal of Oncology*, 2013. **2013**: p. 1-6.
158. Vanderkerken, K., et al., *Multiple myeloma biology: lessons from the 5TMM models*. *Immunological reviews*, 2003. **194**(1): p. 196-206.
159. Aleyd, E., et al., *IgA Enhances NETosis and Release of Neutrophil Extracellular Traps by Polymorphonuclear Cells via Fcα Receptor I*. *The Journal of Immunology*, 2014. **192**(5): p. 2374-2383.
160. Davis, S.K., et al., *Serum IgA Fc effector functions in infectious disease and cancer*. *Immunology & Cell Biology*, 2020. **98**(4): p. 276-286.
161. Stacey, H.D., et al., *IgA potentiates NETosis in response to viral infection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021. **118**(27).
162. Chen, X.Q., et al., *The Involvement of Neutrophil Extracellular Traps in Disease Activity Associated With IgA Vasculitis*. *Front Immunol*, 2021. **12**: p. 668974.
163. Aleyd, E., et al., *IgA Complexes in Plasma and Synovial Fluid of Patients with Rheumatoid Arthritis Induce Neutrophil Extracellular Traps via FcαRI*. *The Journal of Immunology*, 2016. **197**(12): p. 4552-4559.
164. Okamoto, Y., et al., *Association of Sputum Neutrophil Extracellular Trap Subsets With IgA Anti-Citrullinated Protein Antibodies in Subjects at Risk for Rheumatoid Arthritis*. *Arthritis & Rheumatology*, 2022. **74**(1): p. 38-48.
165. *The Blood Coagulation Mechanism in Multiple Myeloma*. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 2003. **29**(3): p. 275-282.
166. Carr Jr, M.E., R.M. Dent, and S.L. Carr, *Abnormal fibrin structure and inhibition of fibrinolysis in patients with multiple myeloma*. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1996. **128**(1): p. 83-88.
167. Deitcher, S.R., J.K. Erban, and S.A. Limentani, *Acquired free protein S deficiency associated with multiple myeloma: a case report*. *American journal of hematology*, 1996. **51**(4): p. 319-323.
168. Arman, M. and K. Krauel, *Human platelet IgG Fc receptor FcγRIIA in immunity and thrombosis*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2015. **13**(6): p. 893-908.
169. Patel, P., et al., *Platelet FcγRIIA in immunity and thrombosis: Adaptive immunothrombosis*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2021. **19**(5): p. 1149-1160.

170. Kulkarni, U., et al., *IL-10 mediates plasmacytosis-associated immunodeficiency by inhibiting complement-mediated neutrophil migration*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2016. **137**(5): p. 1487-1497.e6.
171. Downing, L.J., et al., *IL-10 regulates thrombus-induced vein wall inflammation and thrombosis*. J Immunol, 1998. **161**(3): p. 1471-6.
172. Henke, P.K., et al., *Viral IL-10 Gene Transfer Decreases Inflammation and Cell Adhesion Molecule Expression in a Rat Model of Venous Thrombosis*. The Journal of Immunology, 2000. **164**(4): p. 2131-2141.
173. Djunic, I., et al., *Specific Binding of Paraprotein to Platelet Receptors as a Cause of Platelet Dysfunction in Monoclonal Gammopathies*. Acta Haematologica, 2013. **130**(2): p. 101-107.
174. Djunic, I., et al., *The Effect of Paraprotein on Platelet Aggregation*. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2014. **28**(2): p. 141-146.
175. Qian, K., et al., *Functional expression of IgA receptor Fc α RI on human platelets*. Journal of Leukocyte Biology, 2008. **84**(6): p. 1492-1500.
176. Leebeek, F.W., *Update of thrombosis in multiple myeloma*. Thrombosis Research, 2016. **140**: p. S76-S80.
177. Neumann, F.-J., et al., *Effect of Human Recombinant Interleukin-6 and Interleukin-8 on Monocyte Procoagulant Activity*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 1997. **17**(12): p. 3399-3405.
178. Minnema, M.C., et al., *Extremely high levels of von Willebrand factor antigen and of procoagulant factor VIII found in multiple myeloma patients are associated with activity status but not with thalidomide treatment*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2003. **1**(3): p. 445-449.
179. Cesarman-Maus, G., E. Braggio, and R. Fonseca, *Thrombosis in multiple myeloma (MM)*. Hematology, 2012. **17**(sup1): p. s177-s180.
180. Swystun, L.L., et al., *Chemotherapeutic agents doxorubicin and epirubicin induce a procoagulant phenotype on endothelial cells and blood monocytes*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2009. **7**(4): p. 619-626.

X. Danksagung

Zunächst geht mein Dank an Herrn Prof. Dr. med. Konstantin Stark, der mir das Vertrauen entgegenbrachte, in seiner Forschungsgruppe arbeiten zu können und dieses Projekt wissenschaftlich geleitet hat. Hierbei möchte ich mich insbesondere für den stets hilfreichen und freundlichen Austausch sowie für die Durchsicht und Korrektur meiner Arbeit bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn PhD. Badr Kilani für die hervorragende Einarbeitung in die Laborarbeit und die fachliche Unterstützung während meiner Promotionszeit bedanken. Als erster Ansprechpartner hatte er stets ein offenes Ohr für jegliche wissenschaftliche sowie persönliche Angelegenheiten und zeigte durchweg große Hilfsbereitschaft.

Bei Herrn Dr. med. Sven Stockhausen möchte ich mich für seine zahlreichen Hilfestellungen bei der Anfertigung und Interpretation der Thrombuspräparate bedanken. Ebenso bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Aggregometrierversuche.

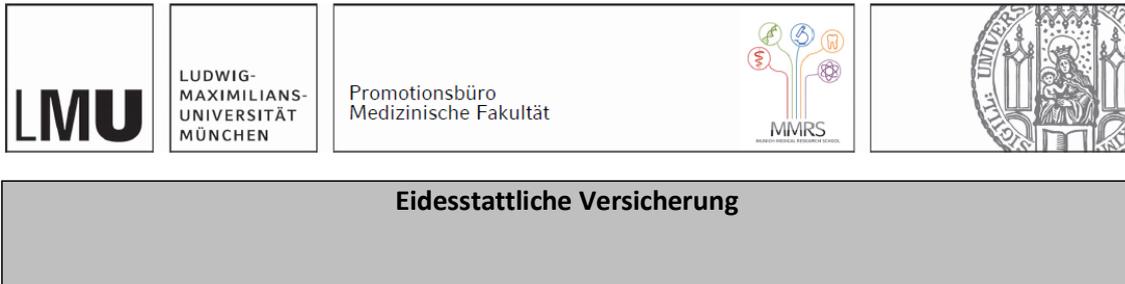
Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Steffen Ormanns danke ich vielmals für die Überprüfung und Interpretation der Paraffinschnitte.

Mein Dank geht insbesondere auch an Frau Dr. med. vet. Susanne Sauer, Herrn Michael Lorenz, Frau Zeljka Sisic, Frau Anna Titova, Frau Elisabeth Raatz und Herrn Dominic van den Heuvel für die technische Unterstützung.

In Erinnerung bleiben wird mir außerdem die angenehme und außergewöhnlich kollegiale Arbeitsatmosphäre in der AG Stark. In der Arbeitsgruppe habe ich nicht nur jederzeit tatkräftige Unterstützung erhalten, sondern auch zahlreiche neue Freunde gefunden. Meinen Dank schulde ich insbesondere Frau Franziska Wendler, Herrn Luke Eivers, Herrn Alejandro Martínez Navarro und Herrn Augustin Droste zu Senden, um nur einige wenige zu nennen.

Zu guter Letzt bin ich meiner Familie zu großem Dank verpflichtet, die mir während meiner Studiums- und Promotionszeit stets mit Rat und Tat zur Seite stand und mich auf meinem Weg begleitete.

XI. Affidavit



Stephan, Felix

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Die Rolle des Immunglobulin A - Paraproteins in der Entstehung der venösen Thrombose im Mausmodell des Multiplen Myeloms

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Stadtbergen, 31.01.2024

Ort, Datum

Felix Stephan

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

XII. Lebenslauf

XIII. Publikationsliste

In Revision (2024): Immunity - Antibodies and complement are key drivers of thrombosis